

**Argininderivatisierung und 1,2-Dicarbonylverbindungen in
Lebensmitteln**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

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



vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Dipl.-Lebensmittelchem. Elvira Mavric

Geboren am 22. Juli 1976 in Kragujevac, Serbien und Montenegro

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. T. Henle
Prof. Dr. rer. nat. B. Johannsen
Prof. Dr. rer. nat. S. Kulling

Eingereicht am: 24. Oktober 2005

Tag der Disputatuion: 09. Februar 2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Theorieteil.....	3
2.1 Grundlagen der Maillard-Reaktion.....	3
2.1.1 Frühphase der Maillard-Reaktion.....	3
2.1.2 Fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion	4
2.1.2.1 Folgeprodukte der 3-Desoxyglucosulose	6
2.1.2.2 Folgeprodukte der 1- und 4-Desoxyglucosone.....	7
2.1.3 Fragmentierungsreaktionen von Kohlenhydraten	8
2.1.3.1 Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln	9
2.1.3.2 Dicarbonylverbindungen in vivo	11
2.1.3.3 Physiologische Folgen.....	14
2.2 Lactoseabbau im Laufe der Maillard-Reaktion.....	15
2.2.1 Lactoseabbau im alkalischen Milieu	15
2.2.2 Bildung von C5-Carbonylverbindungen	18
2.2.2.1 Bildung von 3-Desoxypentulose (3-DP)	18
2.2.2.2 Bildung von 3-Desoxypentosulose (3-DPs).....	19
2.3 Beteiligung von Arginin an der Maillard-Reaktion.....	21
2.3.1 Reaktionen der Guanidinogruppe mit Aldehyden und Diketonen	21
2.3.2 Argininderivatisierung im Laufe der Maillard-Reaktion.....	22
2.3.3 Quervernetzungsreaktionen des Arginins.....	24
2.3.4 Konsequenzen der Argininderivatisierung für Lebensmittel.....	26
2.3.5 Physiologische Folgen.....	28
2.4 Antibakterielle Eigenschaften von Honig.....	29
2.4.1 Qualitätsanforderungen an Honig.....	29
2.4.2 Antibakterielle Wirkung von Honig.....	32
2.4.2.1 Osmotischer Effekt.....	33
2.4.2.2 Acidität	33
2.4.2.3 Wasserstoffperoxid.....	33
2.4.2.4 Nicht-peroxid Faktoren	34
2.4.3 Manuka-Honig.....	36
3 Material und Methoden	39
3.1 Chemikalien und Geräte	39
3.1.1 Chemikalien.....	39
3.1.2 Geräte und Hilfsmaterial	41
3.2 Handelsproben und Erhitzungsansätze.....	42
3.2.1 Handelsproben.....	42
3.2.2 Erhitzungsansätze	42
3.2.2.1 Modellansätze mit Standardsubstanzen.....	42
3.2.2.2 Caseinisolat aus Milchproben.....	43
3.2.2.3 Casein/ Lactose Erhitzungsansätze.....	43
3.2.2.4 Lactose Erhitzungsansätze.....	44
3.2.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino- acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)....	44
3.2.3.1 Einfluß des pH-Wertes	44
3.2.3.2 Einfluß der Inkubationszeit und Temperatur.....	44
3.2.3.3 Einfluß des molaren Verhältnisses Hip-Arg:Lactose	44
3.3 Analytische Methoden.....	45
3.3.1 Hydrolysesysteme.....	45

3.3.1.1 Säurehydrolyse.....	45
3.3.1.2 Enzymatische Hydrolyse.....	46
3.3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	46
3.3.2.1 Gerätesystem und Probenvorbereitungen	46
3.3.2.2 Untersuchungen zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)	47
3.3.2.3 Untersuchungen zur Bildung von Chinoxalinen.....	48
3.3.2.4 Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF).....	49
3.3.3 Ionenaustauschchromatographie.....	49
3.3.3.1 Gerätesystem.....	49
3.3.3.2 Chromatographische Trennung von Argininderivaten	50
3.3.3.3 Tüpfeltest	51
3.3.4 Aminosäureanalyse.....	51
3.3.4.1 System und Probenvorbereitung	51
3.3.4.2 Puffer und Reagenzien.....	52
3.3.4.3 Trennprogramm für Aminosäuren	52
3.3.5 Flüssigchromatographie- Massenspektroskopie (LC-MS)	53
3.3.5.1 Gerätesystem.....	53
3.3.5.2 Probenvorbereitung.....	54
3.3.6 Gaschromatographie- Massenspektroskopie (GC-MS)	54
3.3.6.1 Gerätesystem für die Bestimmung von Kohlenhydraten	54
3.3.6.2 Probenvorbereitung.....	54
3.3.6.3 Gerätesystem für die Bestimmung von Ornithin	55
3.3.7 Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID).....	55
3.3.7.1 Gerätesystem.....	55
3.3.7.2 Probenvorbereitung.....	56
3.3.8 Spektroskopische Untersuchungen	56
3.3.8.1 Nuklearmagnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	56
3.3.8.2 Elementaranalyse	57
3.4 Darstellung von Referenzmaterial	57
3.4.1 Darstellung von Argininderivaten.....	57
3.4.1.1 Isolierung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO).....	57
3.4.1.2 Synthese und Isolierung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)	58
3.4.2.1 Isolierung von 3-Desoxypentulose (3-DP)	60
3.4.2.2 Isolierung von Verbindung X	61
3.4.2.3 Synthese von 3-Desoxypentulose (3-DPs)	61
3.4.2.4 Isolierung von Verbindung Y	62
3.4.2.5 Synthese von 3,4-Didesoxypentulose (3,4-DDPs).....	63
3.5 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von PIO	64
3.5.1 Inkubation von N- α -Hippuryl- bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin mit Lactose und Lactoseabbauprodukten	64
3.5.1.1 Inkubation von N- α -Hippuryl-L-arginin mit Lactose.....	64
3.5.1.2 Inkubation von N- α -Hippuryl-L-arginin mit anderen Kohlenhydraten.....	64
3.5.1.3 Inkubation von N- α -Hippuryl- bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin mit Lactose-abbauprodukten	65
3.5.1 Inkubation von 3,4-Didesoxypentulose mit Casein.....	65
3.6 Strukturaufklärung der Hydrolyseprodukte von PIO.....	66
3.6.1 Isolierung der Säurehydrolyseprodukte von PIO.....	66
3.6.2 Untersuchungen zur Bildung von Ornithin.....	66
3.6.3 EZ:faast für Säurehydrolysate.....	67

3.7 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln.....	68
3.7.1 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milchprodukten	68
3.7.2 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honigen	70
3.7.2.1 Handelsproben.....	70
3.7.2.2 Probenvorbereitung und das analytische System	72
3.7.3 Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig.....	73
3.7.4 Antibakterielle Eigenschaften von Honigen.....	74
3.7.4.1 Abschätzung des Wasserstoffperoxidgehaltes.....	74
3.7.4.2 Antibakterielle Eigenschaften der 1,2-Dicarbonylverbindungen	74
3.7.4.3 Probenaufarbeitung und die Durchführung des Lochgardiffusionstestes.....	76
4 Ergebnisse und Diskussion.....	78
4.1 Isolierung und Strukturaufklärung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) und von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO).....	79
4.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO).....	79
4.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)	83
4.2 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)	86
4.2.1 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit Kohlenhydraten.....	86
4.2.1.1 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit 3-Desoxypentulose.....	86
4.2.1.2 Abbaumechanismus von 3-Desoxypentulose.....	90
4.2.1.3 Synthese und Strukturaufklärung von 3-Desoxypentulose.....	91
4.2.1.4 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit 3-Desoxypentulose	95
4.2.2 Umsetzung von Lactose mit o-Phenylendiamin.....	96
4.2.2.1 Inkubation von Lactose mit und ohne N- α -Hippuryl-arginin.....	97
4.2.2.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Y.....	101
4.2.2.3 Synthese und Strukturaufklärung von 3,4-Didesoxypentulose.....	105
4.2.2.4 Umsetzung von 3,4-Didesoxypentulose-Isolat mit N- α -Hippuryl-arginin bzw. mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin	107
4.2.2.5 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von 3,4-Didesoxypentulose.....	108
4.3 Studien zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) in Modellansätzen	112
4.3.1 Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) in Modellansätzen	113
4.3.2 Enzymatische Hydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO).....	117
4.3.2.1 Bestimmung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Modellansätzen.....	117
4.3.2.2 Bestimmung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Lebensmittelmodellen und in Lebensmitteln	119
4.3.3 Säurehydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO).....	123
4.3.3.1 Säurehydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Modellansätzen.....	124
4.4 Isolierung von Hydrolyseprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)	128
4.4.1 Präparative Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von Hydrolyseprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO).....	128

4.4.2	Strukturaufklärung von Abbauprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO).....	129
4.4.3	Bedeutung und Bildung von Ornithin <i>in vivo</i> und während der Maillard-Reaktion	131
4.5	Bestimmung von Carbonylverbindungen in Lebensmitteln	136
4.5.1	Bestimmung von 3-Desoxypentulose in Milchprodukten	137
4.5.2	Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milch und Milchprodukten ...	141
4.5.2.1	Ermittlung statistischer Größen	141
4.5.2.2	Bestandsaufnahme von α -Dicarbonylen in Milchprodukten.....	142
4.5.3	Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig.....	146
4.5.3.1	Optimierung der Probenaufarbeitung zur Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig	147
4.5.3.2	Bestimmung von Carbonylverbindungen in Honigen	148
4.5.4	Antibakterielle Eigenschaften von Honigen	156
4.5.4.1	Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes	156
4.5.4.2	Antibakterielle Eigenschaften von 1,2-Dicarbonylverbindungen.....	157
4.5.4.3	Konsequenzen des hohen Methylglyoxal-Gehaltes	164
5	Zusammenfassung.....	166
6	Ausblick	169
7	Literaturverzeichnis	170
8	Anhang	181
8.1	Parameter für flüssigchromatographisch- massenspektroskopische Untersuchungen.	181
8.1.1	Geräteeinstellung für die Bestimmung von Hippuryderivaten	181
8.1.2	Geräteeinstellung für die Bestimmung von N-tert-Butoxycarbonyl-Derivaten....	183
8.1.3	Geräteeinstellung für die Bestimmung von Chinoxalinen.....	185
8.1.4	Elektronenstoßionisation-Time of Flight Messung (ESI-TOF)	187
8.1.4.1	t-Butoxycarbonylamino-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Boc-PIO)	187
8.1.4.2	N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO).....	188
8.1.4.3	3,4-Didesoxypentulose	189
8.2	Bestimmung von 3-Desoxypentulose in Milch.....	190
8.2.1	Ermittlung der Kalibriergerade für 3-Desoxypentulose.....	190
8.2.2	Bestimmung von 3-Desoxypentulose in Milch.....	191
8.3	Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln	192
8.3.1	Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milchprodukten	192
8.3.2	Bestimmung von Carbonylverbindungen in Honigen	197
8.3.2.1	Ermittlung der Kalibriergeraden von 1,2-Dicarbonylverbindungen.....	197
8.3.2.2	Bestandsaufnahme von Honigen.....	200
8.3.3	Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig	203
8.3.3.1	Ermittlung der Kalibriergerade für 5-Hydroxymethylfurfural.....	203
8.3.3.2	Ermittlung des Gehaltes von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig.....	204

Abkürzungsverzeichnis

1,4-DDH	1,4-Didesoxyhexosulose
1-DG	1-Desoxyglucoson
3,4-DDPs	3,4-Didesoxypentosulose
3-DG	3-Desoxyglucoson
3-DP	3-Desoxypentulose
3-DPs	3-Desoxypentosulose
4-DG	4-Desoxyglucoson
Abb.	Abbildung
AGE	Advanced Glycation Endproduct
ASA	Aminosäureanalyse
BG	Bestimmungsgrenze
Boc	tertiär-Butyloxycarbonyl
BSA	Bovin Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CML	N-ε-Carboxymethyllysin
CHD	1,2-Cyclohexandion
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	effective cell growth
ESI-TOF-MS	electro spray ionisation-time of flight-mass spectrometry
et al.	et alii (lat.) und andere
evtl.	eventuell
GC-FID	Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GO	Glyoxal
Hip-Arg	N-α-Hippuryl-L-arginin
Hip-PIO	2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HPMC	humane peritoneale Mesothelzellen

Abkürzungsverzeichnis

HSA	Human Serum Albumn
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
LC-MS	liquidchromatography-mass-spectroscopy
m/z	Masse/ Ladung
MGO	Methylglyoxal
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
NG	Nachweisgrenze
NMR	nuclear magnetic resonance
OPD	o-Phenylendiamin
PD	Peritoneal Dialyse
PIO	N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin
RC	regenerierte Cellulose
RP-HPLC	Reversed phase high pressure liquid chromatography
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SIM	single ion monitoring
SL	Stammlösung
SPE	Solid Phase Extraction
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	total ion current
TMS	Trimethylsilyl
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit
UMF	unique manuka factor
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung und Zielstellung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Veränderungen in Lebensmitteln, die als Folge der Maillard-Reaktion zustande kommen. Bisher haben sich die meisten Arbeitsgruppen mit der Derivatisierung des Lysins befasst. Jedoch trägt auch Arginin als eine basische, semi-essentielle Aminosäure zu einem wesentlichen Anteil zur nicht-enzymatischen Bräunung bei. Reaktionen am proteingebundenen Arginin wurden sehr lange Zeit aufgrund der Instabilität seiner Derivate wenig untersucht. Daher gibt es in der Literatur nur wenige Angaben bezüglich der Argininderivatisierung in Modellansätzen. In Lebensmitteln konnten bisher nur wenige Produkte des Arginins quantifiziert werden. Hierbei handelt es sich um direkte Reaktionsprodukte des Arginins mit den aus dem Zuckerabbau stammenden 1,2-Dicarbonylverbindungen. Von besonderem Interesse sind Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose, da sie nicht nur zur Ausbildung der so genannten Advanced Glycation Endproducts (AGEs) des Arginins und Lysins führen, sondern auch für die Quervernetzung der Proteine verantwortlich sind. Des Weiteren sind 1,2-Dicarbonylverbindungen aufgrund ihrer Reaktivität im Verdacht, mutagene oder kanzerogene Eigenschaften zu besitzen.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit den Reaktionen des Arginins mit Abbauprodukten von Disacchariden, vor allem der 1,4-glycosidisch verknüpften Disaccharide Lactose oder Maltose. In Milch und Milchprodukten, aber auch in maltosehaltigen Lebensmitteln wie Laugengebäck oder Bier konnte ein Argininabbau nach enzymatischer Hydrolyse von bis zu 30 % beobachtet werden (*Henle et al., 1994*). Nach Säurehydrolyse fällt die Abbaurate des Arginins geringer aus als nach enzymatischer Hydrolyse, was darauf hindeutet, dass säurelabile Argininderivate entstehen, die während der Säurehydrolyse zu einer Rückbildung des Arginins beitragen. Es konnte beobachtet werden, dass im Zusammenhang mit dem Argininabbau in den disaccharidhaltigen Systemen die Bildung von neuen Argininderivaten stattfindet. Hierbei konnte ein Signal im basischen Bereich des Aminosäurechromatogramms als Hauptderivatisierungsprodukt des Arginins identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Isolierung, Strukturaufklärung und Identifizierung dieser Verbindung vorgenommen und ihr Bildungsmechanismus aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte nach der Strukturaufklärung ein Nachweis mit anschließender Quantifizierung dieses Argininderivates in Lebensmitteln vorgenommen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln untersucht. Zum einen wurden Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucoson als am häufigsten vorkommende 1,2-Dicarbonylverbindungen untersucht und deren Gehalt in Milch und Milchprodukten bestimmt. Mit der Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen

1 Einleitung und Zielstellung

in Lebensmitteln haben sich bisher nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigt. So ist bisher der Gehalt an 3-Desoxyglucoson nur in Honigen bestimmt worden (*Weigel et al., 2004*), wogegen Glyoxal und Methylglyoxal in verschiedenen Lebensmitteln wie z.B Kaffee, Essig, Wein, Butter bestimmt worden sind. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milch, Milchprodukten und in Honigen vorgenommen.

Da schon *Weigel et al. (2004)* feststellen konnten, dass Honig sehr reich an Carbonylverbindungen ist, und zudem aus der Literatur bekannt ist, dass diese Verbindungen *in vitro* antibakteriell wirken (*Sourtti et al., 1984*), stellte sich die Frage, ob 1,2-Dicarbonylverbindungen für die schon seit Jahrtausenden bekannte antibakterielle Wirkung der Honige mitverantwortlich sein können. Es galt im dritten Teil der Arbeit, einen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honigen und einer daraus ableitbaren antibakteriellen Wirkung zu untersuchen.

2 Theorieteil

2.1 Grundlagen der Maillard-Reaktion

Lebensmittel sind während der Herstellung, Lagerung oder Zubereitung Veränderungen ausgesetzt, die erwünschte, aber auch unerwünschte Effekte zur Folge haben können. *Mecham und Olcott (1947)* konnten beim Erhitzen von Proteinen bei 110 bis 200 °C eine Verringerung der Verdaubarkeit und Löslichkeit der Proteine beobachten. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der Aminogruppen proportional zur Inkubationstemperatur verzeichnet. Außer der Denaturierung von Proteinen bei hohen Temperaturen finden auch andere Reaktionen statt, die zum Verlust an Aminosäuren und gleichzeitig zur Verminderung der biologischen Wertigkeit der Proteine beitragen.

Man unterscheidet drei Typen von Bräunungsreaktionen. Die Reaktion zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und freien oder proteingebundenen Aminosäuren ist als nicht-enzymatische Bräunung oder Maillard-Reaktion bekannt. Sie hat einen zentralen Stellenwert bei Lebensmittelverarbeitungsprozessen und *in vivo*. Zum zweiten Typ gehört die Karamellisierung, die beim Erhitzen von Kohlenhydraten unter drastischeren Bedingungen als die Maillard-Reaktion selbst bei Abwesenheit von Aminokomponenten abläuft. Karamellisierungsreaktionen werden oft zur Maillard-Reaktion gezählt. Beide Reaktionstypen benötigen keinen Sauerstoff, um eine Bräunung auszulösen. Zum dritten Typ, der enzymatischen Bräunung, gehören Reaktionen, die oxidativ unter Beteiligung von Sauerstoff ablaufen (*Hodge, 1953*). Hierunter versteht man die Oxidation von Ascorbinsäure oder von Polyphenolen zu Di- oder Polycarbonylverbindungen.

2.1.1 Frühphase der Maillard-Reaktion

Da die Maillard-Reaktion ein sehr komplexes Reaktionsgeschehen darstellt und ein sehr vielfältiges und inhomogenes Spektrum an Reaktionsprodukten liefert, wurde sie in drei Phasen mit den für die jeweilige Phase charakteristischen Reaktionsprodukten aufgeteilt (*Hodge, 1953*). In der Frühphase der Maillard-Reaktion kommt es zur Bildung eines Amadori-Produktes (5) ausgehend von Glucose (1) über eine nukleophile Addition der Aminokomponente an die Carbonylfunktion von Zuckern unter Ausbildung von Glucosyliminen (2). Diese sind in der Lage, sich in die entsprechenden 1,2-Glucosylenaminole (3) bzw. 2,3-Glucosylenaminole (4) umzulagern (Abb. 2.1.1-1). Ausgehend von Fructose (6) werden analog zu Amadori-Heyns-Verbindungen (9) über ein Fructosylimin (7) und darauffolgende Umlagerung zu 1,2-Fructosylenaminol (8) gebildet

(Abb. 2.1.1-1). Amadori-Verbindungen sind in erhitzten und gelagerten Lebensmitteln, sowie im Blutserum von Diabetes-Patienten nachweisbar (Ledl & Schleicher, 1990). Heyns-Produkte wurden dagegen bisher in Lebensmitteln noch nicht nachgewiesen. Sie wurden nur in Modellsystemen unter physiologischen Bedingungen bestimmt (Brands et al., 2001). Amadori- und Heyns-Produkte gehören zu den Zwischenprodukten der Frühphase der Maillard-Reaktion, aus welchen weitere Verbindungen resultieren, die aus lebensmitteltechnologischer und physiologischer Sicht von Bedeutung sind.

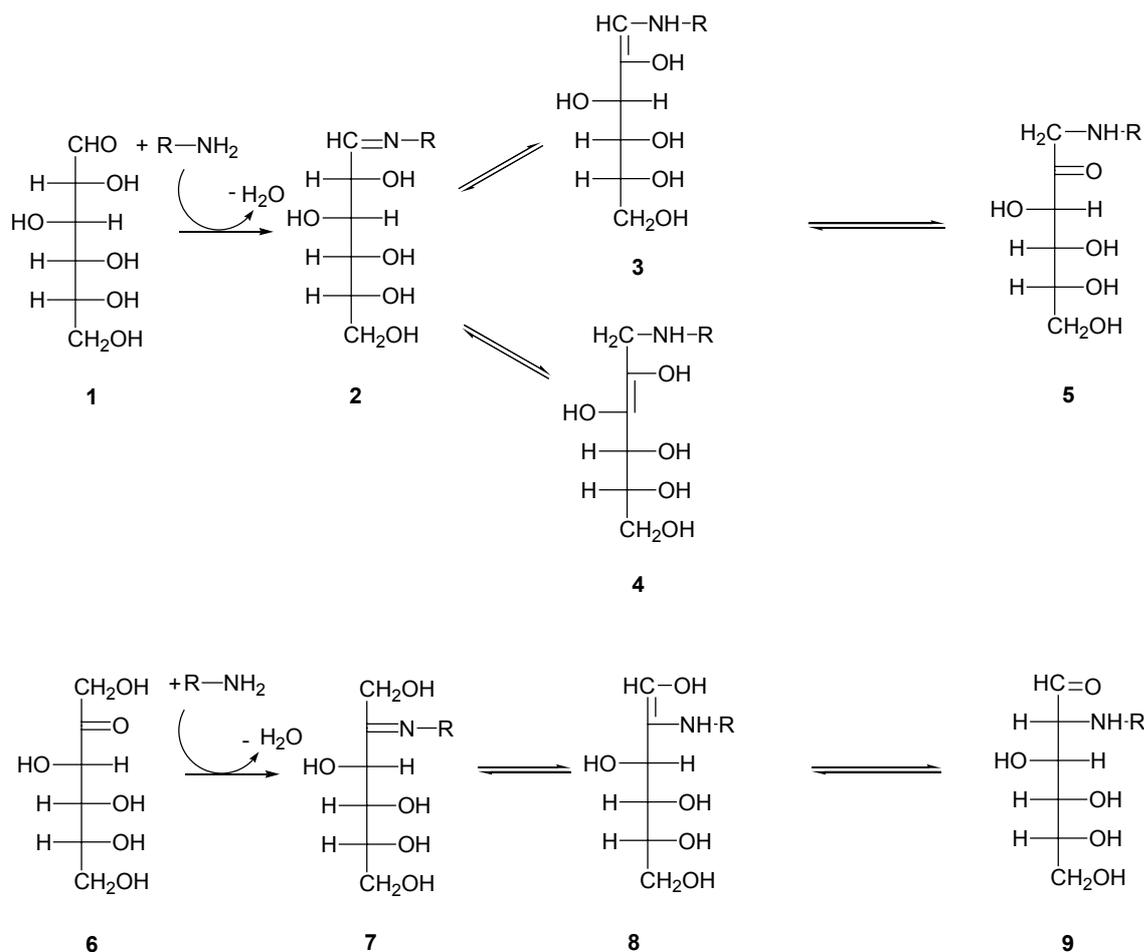


Abbildung 2.1.1-1: Reaktionsschema zur Bildung von Amadori- und Heyns-Produkten in der Frühphase der Maillard-Reaktion

2.1.2 Fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion

In der fortgeschrittenen Phase wird das Amadori- bzw. Heyns-Produkt zu Desoxyosonen abgebaut. Es sind drei wichtige Hauptwege der Desoxyosonbildung beschrieben (Ledl & Schleicher, 1990; Belitz, 2001). Über das 1,2-Enaminol (3) erfolgt die Bildung von 3-Desoxyglucosulose (3-DG) (Abb. 2.1.2-1, 10). Über das 2,3-Enaminol (4) werden 1-Desoxyoson (1-DG) und das 4-Desoxyoson (4-DG) gebildet (Abb. 2.1.2-1, 11 und 12).

Desoxyosone gehören zu den 1,2-Dicarbonylverbindungen, die als stabile Chinoxalinderivate mittels o-Phenylendiamin (OPD) abgefangen werden können (*Glomb, 2000*). 1-DG ist ein sehr reaktives Zwischenprodukt, welches bis vor kurzem nur als das entsprechende Chinoxalinderivat erfasst werden konnte. Die Synthese von 1-DG wird von *Glomb (2000)* beschrieben. Es zeigte sich in Inkubationsansätzen mit Proteinen als sehr reaktiv und trug stärker zur Bräunung der Proteinlösungen bei als das 3-DG.

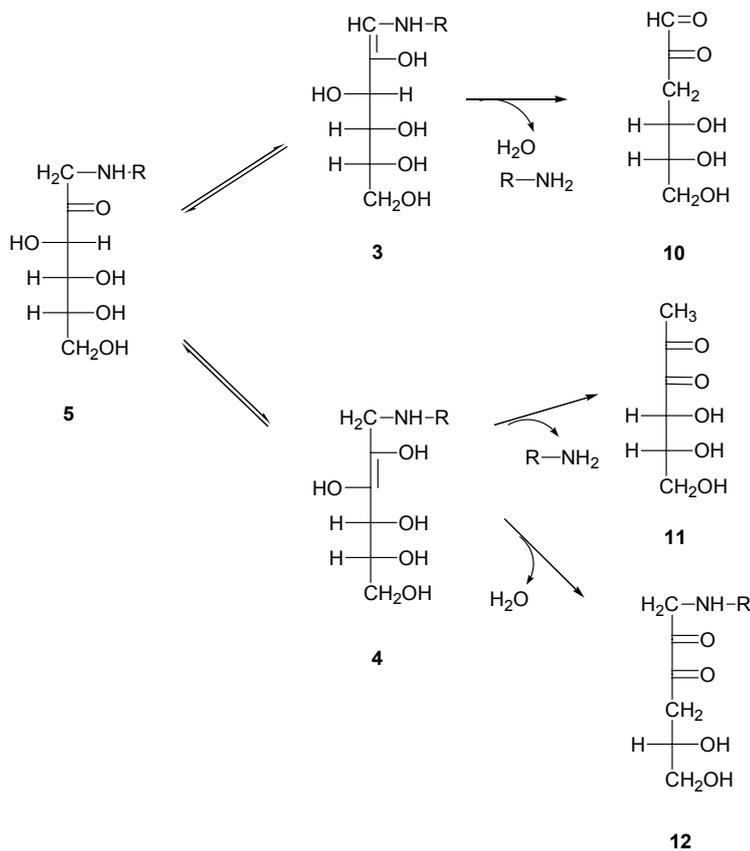


Abbildung 2.1.2-1: Bildung von 1-, 3- und 4-Desoxyoson (10, 11 und 12)

Anet (1960) synthetisierte die 3-Desoxyglucosulose aus Di-D-Fructose-Glycin und untersuchte ihre Umsetzung zu 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyd und Metasaccharinsäure. Er stellte fest, dass 3-DG ein wichtiges, sehr reaktives Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion darstellt. 3-DG wird sowohl in erhitzten Lebensmitteln als auch *in vivo* gebildet (siehe 2.1.3.1 und 2.1.3.2).

4-Desoxyglucosulose (4-DG) wird bevorzugt aus Disacchariden wie Lactose oder Maltose gebildet. 4-DG konnte bisher als freie Verbindung nicht erfasst werden, und ist nur in Form des entsprechenden Chinoxalins nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin (OPD) nachgewiesen worden (*Beck et al., 1989*). *Pischetsrieder et al. (1998)* beschreiben eine RP-HPLC Bestimmung des Aminoreduktons, welches aus Lactose und N- α -Acetyl-Lysin über die Bildung von 4-Desoxyglucosulose entsteht.

2.1.2.1 Folgeprodukte der 3-Desoxyglucosulose

Die fortgeschrittene Maillard-Reaktion ist durch Dehydratisierungs- und Fragmentierungsreaktionen der Kohlenhydratkomponente gekennzeichnet. Das wichtigste Folgeprodukt der 3-Desoxyglucosulose ist das 5-(Hydroxymethyl)-2-furfuraldehyd (HMF) (Abb. 2.1.2.1-2, **13**). *Hodge (1953)* beschrieb die Bildung von HMF über das 1,2-Enaminol in Modellansätzen aus Glucose und Glycin. Das HMF wird auf zwei Wegen gebildet. Zum einen kann es aus dem Lactoseabbau über das Amadori-Produkt Lactuloselysin entstehen (*Morales et al., 1998*). Zum anderen wird es durch Abbaureaktionen von Kohlenhydraten über eine 1,2-Enolisierung und Bildung von 3-DG bei niedrigeren pH-Werten gebildet, wie z.B. in Honig oder in Fruchtsäften (*Morales et al., 1997; Morales et al., 1998; Berg, 1993*). Der HMF-Gehalt wird als Marker für die Hitzebehandlung oder Lagerung von Lebensmitteln herangezogen. In Abhängigkeit von der Temperatur und Lagerzeit nimmt der Gehalt an HMF zu. *Berg (1993)* fand einen Gehalt von 4,0 $\mu\text{mol HMF/l}$ Milch nach 1,5 s Erhitzung bei 140 °C, der nach 64 s auf 33,5 $\mu\text{mol/l}$ anstieg. Wenn die Lagertemperatur der Milch zwischen 4 °C und 20 °C liegt, bleibt der HMF-Gehalt über einen Zeitraum von 6 Monaten konstant (*Renner, 1988*). Ab 35 °C Lagertemperatur wird HMF gebildet und ab einer Konzentration von 16 $\mu\text{mol/l}$ wird der Geschmack der Milch beeinträchtigt (*Renner, 1988*). Außer als Qualitätsparameter für die Hitzebehandlung von Milch wird der HMF-Gehalt zur Beurteilung von Honig herangezogen. Nach der Honigverordnung (HonigV 2004, Anlage 2) darf der HMF Gehalt in deutschen Honigen den Wert von 40 mg/ kg nicht überschreiten (vgl. 2.4.1).

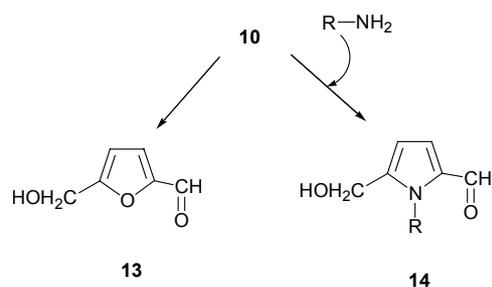


Abbildung 2.1.2.1-1: Folgeprodukte der 3-Desoxyglucosulose: 5-Hydroxymethyl-2-furfuraldehyd (**13**); 2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrol (**14**)

Sind größere Mengen an primären Aminen oder Aminosäuren vorhanden, wird die Bildung von HMF unterdrückt, und es kommt bevorzugt zur Ausbildung von 2-Formyl-5-hydroxymethyl-pyrrolen (Abb. 2.1.2.1-1, **14**). Ist der Rest R- ein Lysinrest, so handelt es sich bei der Verbindung **14** um das Pyrralin (*Ledl & Schleicher, 1990*). Unter schwach sauren Bedingungen erfolgt eine rasche Bildung von Pyrralin, dessen Gehalt mit zunehmender Zuckerkonzentration sowie Temperatur zunimmt (*Portero-Otin et al., 1995*).

2.1.2.2 Folgeprodukte der 1- und 4-Desoxyglucosone

Die wichtigsten Abbauprodukte des 1-Desoxyglucosons (**11**) sind in Abb. 2.1.2.2-1 zusammengefasst. Das bevorzugt aus den Disacchariden Maltose oder Lactose entstehende Maltol (**16**) ist ein universeller Indikator der Maillard-Reaktion. Das β -Galactosylisomaltol (**17**) ist als Hauptprodukt aus dem Lactoseabbau in erhitzter Milch nachgewiesen worden (*Ledl et al., 1990; Kramhöller et al., 1991*). In UHT- und Sterilmilch wurden Gehalte von 0,51 bis 5,58 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt (*Morales et al., 1999*). Widersprüchliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von *Pellegrino et al. (2001)*, die β -Galactosylisomaltol nur in Spuren in Sterilmilch nachweisen konnten. Dagegen haben sie Galactosyl- β -pyranon (**18**) in allen untersuchten Trinkmilchproben, ausgenommen Rohmilch und pasteurisierte Milch, von 0,04 bis 43,1 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt. Bei niedrigeren pH-Werten und höheren Temperaturen reagiert Galactosyl- β -pyranon zu Galactosylisomaltol (*Ledl et al., 1986*).

Acetylformoin (**15**) ist eine Aromakomponente, die im Laufe der Maillard-Reaktion gebildet wird, und ein Zwischenprodukt im Bildungsmechanismus des Furaneols darstellt (*Schieberle, 1992; Yaylayan et al., 2003*). Furaneol ist für das typische Brot- und Backaroma verantwortlich (*Schieberle, 1992*). Bei Anwesenheit von L-Prolin reagiert Acetylformoin zu mehreren Reaktionsprodukten und führt somit zu einer verstärkten Bräunung der Reaktionsgemische (*Hofmann, 1998*).

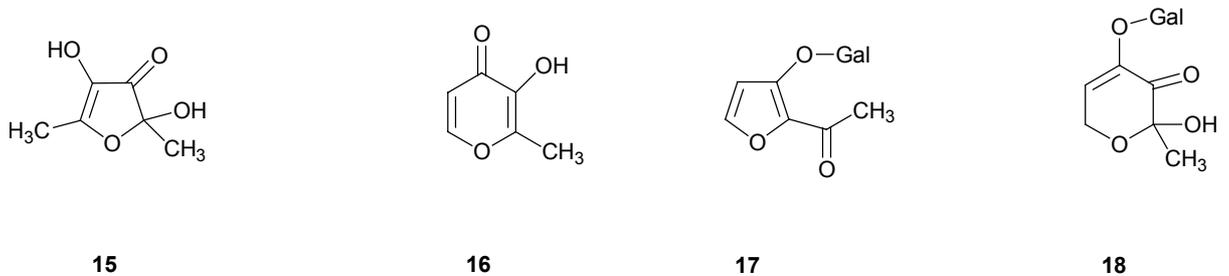
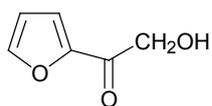
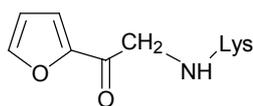


Abbildung 2.1.2.2-1: Folgeprodukte des 1-Desoxyosons: Acetylformoin (**15**), Maltol (**16**), Galactosylisomaltol (**17**) und Galactosyl- β -pyranon (**18**)

In Abwesenheit der Aminokomponente wird das 2-Hydroxyacetyl-furan (Abb. 2.1.2.2-2, **19**) aus 4-Desoxyoson (**12**) gebildet (*Belitz et al., 2001*). Ist dagegen ein Lysinrest am C1 Atom des Amadori-Produktes vorhanden, wird anstatt **19** das Furosin (**20**) gebildet. Furosin (**20**) wird während der Säurehydrolyse aus proteingebundenen Amadori-Produkten des Lysins gebildet und gehört somit nicht zu den primären Produkten der Maillard-Reaktion (*Krause et al., 2003; Krause, 2005*).



19



20

Abbildung 2.1.2.2-2: Folgeprodukte des 4-Desoxyosons: 2-Hydroxyacetylfuran (**19**); Furosin (**20**)

Furosin ist neben HMF ein weiterer Qualitätsparameter für Milch und andere Lebensmittel, der Aussagen über die Hitzebehandlung und Lagerung liefert. Furosin ist weiterhin ein Marker für die frühe Phase der Maillard-Reaktion, der Aussagen über die Lysinblockierung in Lebensmitteln zulässt (Krause, 2005). Der maximale Gehalt an Furosin in Säurehydrolysaten pasteurisierter Milch soll 8 mg/ 100 g Protein betragen, wogegen für UHT-Milch der Gehalt an Furosin von 250 mg/ 100 g Protein nicht überschritten werden soll (Claeys et al., 2004). Furosin ist auch in Fruchtsäften, Marmelade, Nudeln, Babynahrung und Honig nach Säurehydrolyse nachgewiesen worden (zusammengefasst in Mendoza et al., 2002). In allen käuflich erworbenen Marmeladeproben konnten Mendoza et al. (2002) Furosin bestimmen. In Diäterzeugnissen wurden Gehalte von 51,2 bis 224,3 mg/ 100 Protein gefunden. In Marmelade mit über 60 % Zuckergehalt wurden von 119,4 bis 448,3 mg Furosin/ 100 g Protein nachgewiesen. Im Honig (Gelee Royal) konnten in Abhängigkeit von der Lagertemperatur deutliche Unterschiede im Furosingehalt festgestellt werden (Marconi et al., 2002). Nach 10 Monaten Lagerung wurden bei 4 °C Lagertemperatur 100 mg Furosin/ 100 g Protein gefunden, wogegen bei Raumtemperatur die fünffache Menge in derselben Honigprobe nachgewiesen werden konnte.

2.1.3 Fragmentierungsreaktionen von Kohlenhydraten

In der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion können Desoxyosone Fragmentierungsreaktionen eingehen und zur Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen und organischen Säuren wie Essig- und Ameisensäure beitragen (Brand & van Boekel, 2001). Aus diesen Reaktionen entstehen Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), Diacetyl, 2,3-Pentandion, Acetaldehyd, Dihydroxyaceton (Hodge, 1953; Brands & van Boekel, 2001; Weenen, 1998; Kim & Baltes, 1996). Kinetische Studie zur Bildung von Ameisen- und Essigsäure während der Erhitzung von Milch haben Berg und van Boekel (Berg, 1993; Brand & van Boekel, 2001) durchgeführt. Sie konnten eine stetige Zunahme an Ameisen- und Essigsäure in erhitzten Modellansätzen bestehend aus Monosacchariden Glucose, Fructose, Galactose oder Tagatose und Casein messen. Berg (1983) zeigte, dass unter den Bedingungen der UHT-Erhitzung von

Milch keine Ameisensäure gebildet wird. Eine Bildung erfolgt erst nach der Inkubation bei 150 °C für 37 s. Es wurden 0,92 mmol/ kg Ameisensäure nach 37 s bzw. 2,66 mmol/kg nach 88 s gemessen.

Außer als Produkte der Fragmentierungsreaktionen der Kohlenhydrate können 1,2-Dicarbonylverbindungen auch auf anderen Bildungswegen entstehen. Sie werden im Laufe der Maillard-Reaktion aus Amadori- bzw. Heyns-Produkten, bei der Autoxidation von Hexosen (*Wells-Knecht et al., 1995*) oder aus dem Abbau von Fettsäuren (*Glomb, 1997; Weenen, 1998*) gebildet. *In vivo* können α -Dicarbonylverbindungen sowohl als Produkte der Maillard-Reaktion als auch enzymatisch gebildet werden. In Abb. 2.1.3-1 sind einige 1,2-Dicarbonylverbindungen schematisch dargestellt, die bisher in Lebensmitteln, physiologischen Flüssigkeiten und *in vivo* nachgewiesen wurden.

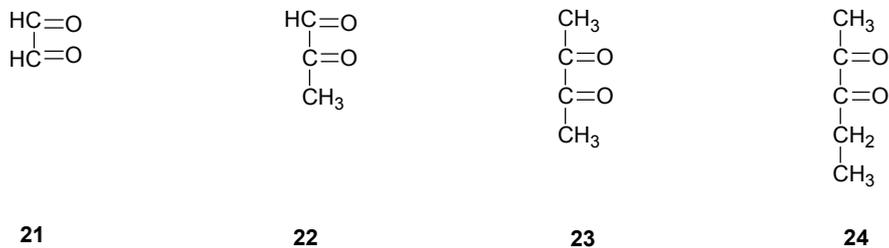


Abbildung 2.1.3-1: 1,2-Dicarbonylverbindungen: Glyoxal (**21**), Methylglyoxal (**22**), Diacetyl (**23**), 2,3-Pentandion (**24**)

Von allen in der Literatur beschriebenen 1,2-Dicarbonylverbindungen fällt ein besonderes Augenmerk auf die kurzkettigen Verbindungen Glyoxal (**21**) und Methylglyoxal (**22**), die aufgrund ihrer hohen Reaktivität durch Proteine abgefangen werden und somit zur Veränderung der Proteinstruktur und Funktionalität führen (vgl. 2.1.3.2).

2.1.3.1 Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln

In der Literatur sind bisher nur wenige Angaben über den Gehalt von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln gemacht worden. Aufgrund der hohen Reaktivität können sie nur schwer quantitativ erfasst werden. Die Bestimmung basiert meist auf der Abfangreaktion mittels o-Phenylendiamin (OPD) oder Aminoguanidin (AG), die, wenn im Überschuss vorhanden, eine Nachproduktion von Dicarbonylverbindungen induzieren und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen können (*Glomb, 2000*). In der Tabelle 2.1.3.1-1 sind in der Literatur veröffentlichten Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen zusammengefasst.

2 Theorieteil

Tabelle 2.1.3.1-1: 1,2-Dicarbonylverbindungen Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), Diacetyl, 2,3-Pentandion und 3-Desoxyglucosulose (3-DG) in Lebensmitteln [mg/ l bzw. mg/ kg]

	Lebensmittel	GO	MGO	Diacetyl	2,3-Pentandion	3-DG
<i>Yamaguchi et al. (1994)</i>	Joghurt	0,917-0,633	1,275-0,605	0,903-2,223	0,481-0,621	-
	Bier	0,023-0,041	0,086-0,238	0,043-0,052	0,04	-
	Wein rot	0,743	0,091	2,752	0,110	-
	Wein weiß	0,505	2,897	0,963	0,140	-
<i>Revel et al. (1993)</i>	Wein rot	0,15- 0,27	0,097-0,368	-	-	-
	gebrühter Bohnen-Kaffee	-	25	-	-	-
	entkoffeinierter Kaffee	-	47	-	-	-
<i>Hayashi et al. (1985)</i>	Instantkaffee	-	23	-	-	-
	Kakao	-	1,2	-	-	-
	Milchpulver	-	1,4	-	-	-
	Sojasauce	-	7,6	-	-	-
	Cola	-	0,23	-	-	-
	Bier	-	0,08	-	-	-
	Wein (weiß)	-	0,11	-	-	-
	Bourbon Whiskey	0,39	1,5	-	-	-
Wein	0,97	0,57	-	-	-	
<i>Nagao et al. (1986)</i>	Instantkaffee	0,34	1,6	-	-	-
	gebrühter Bohnenkaffee	0,87	7,0	-	-	-
	Brot	0,3	0,79	-	-	-
	Toast	0,5	2,5	-	-	-
	Sojasauce	4,9	8,7	-	-	-
<i>Barros et al. (1999)</i>	Weinbrand	0,359	0,648	0,266	-	-
	Solouro	1,509	1,873	0,602	-	-
	Pavao					
	Wein (weiß)	0,505	2,882	0,946	-	-

2 Theorieteil

	Lebensmittel	GO	MGO	Diacetyl	2,3-Pentandion	3-DG
<i>Weigel, K. U. (2004)</i>	Honig	0,2- 2,7	0,4- 5,4	-	-	79- 1266

Wie der Tabelle 2.1.3.1-1 zu entnehmen, gehören die Dicarbonylverbindungen zu den Minorkomponenten des während der Herstellung oder Lagerung von Lebensmitteln stattfindenden Zuckerabbaus. *Weigel et al. (2004)* konnten unerwartet hohe Gehalte für 3-DG in Honigen bestimmen.

2.1.3.2 Dicarbonylverbindungen in vivo

Viele Arbeiten beschäftigen sich mit der Bildung, Entgiftung und Wirkung von Dicarbonylverbindungen *in vivo*. Diesbezüglich sind 3-Desoxyglucosulose, Glyoxal und Methylglyoxal am meisten untersucht. Ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Gehalt an Dicarbonylverbindungen in Körperflüssigkeiten und Diabetes mellitus und Urämie-Erkrankungen wurde in mehreren Arbeiten beschrieben (*Beisswenger et al., 2001; Lodge-Ivey et al., 2004; Beisswenger et al., 1999; Tsukushi et al., 2002; Niwa, 1999*) (Tabelle 2.1.3.2-1). Wie der Tabelle 2.1.3.2-1 zu entnehmen, sind Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen bei Diabetes-Patienten um das Zwei- bis Dreifache höher als bei gesunden. Diese Ergebnisse sind auch in Tierversuchen bestätigt worden (*Yamada et al., 1994; Al-Jassabi, 2004*).

Tabelle 2.1.3.2-1: Übersicht über einige in der Literatur veröffentlichten Gehalte an Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose *in vivo*

	Matrix	GO [mg/ l]		MGO [mg/ l]		3-DG [mg/ l]	
		gesunde	Diabetes kranke	gesunde	Diabetes kranke	gesunde	Diabetes kranke
<i>Mc Lellan et al. (1992)</i>	Blut	-	-	0,018	0,034	-	-
<i>Lapolla et al. (2003)</i>	Plasma	12,5 ± 0,5	27,2 ± 8,6	8,5 ± 0,5	29,3 ± 5,5	-	-
<i>Tsukushi et al. (2002)</i>	Erythrozyten	-	-	-	-	0,6	1,68
<i>Yamada et al. (1994)</i>	Rattenplasma	-	-	-	-	43,9 µg/ l	106 µg/ l

Da die erhöhten Gehalte der Glucoseabbauprodukte bei Diabeteskranken gemessen werden konnten, stellte sich die Frage, inwieweit ein Glucoseabbau in Lösungen für Peritoneal Dialyse (PD-Lösungen) im Zusammenhang mit der Urämie-Erkrankung stattfindet. PD-Lösungen können unterschiedliche Konzentrationen an Glucose aufweisen. Sie werden bei Patienten mit chronischem Nierenversagen zur Dialyse eingesetzt und enthalten 1 bis 4 % Glucose. Da diese Lösungen vor dem Einsatz sterilisiert werden müssen, sind in Abhängigkeit von der Art der Sterilisierung und vom pH-Wert unterschiedlich hohe Gehalte an Glucoseabbauprodukten zu erwarten (*Ishikawa et al., 2003; Wieslander et al., 1991; Wieslander et al., 1995*). Tabelle 2.1.3.2-2 zeigt, inwiefern die Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucoson von der Art der Sterilisierung sowie vom pH-Wert voneinander abweichen (*Okabe et al., 2004*).

Tabelle 2.1.3.2-2: Gehalte an Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose in PD-Lösungen in Abhängigkeit von der Art der Sterilisation (*Okabe et al., 2004*)

	Glucose [%]	3-DG [$\mu\text{mol/l}$]	GO [$\mu\text{mol/l}$]	MGO [$\mu\text{mol/l}$]
hitzesterilisiert pH 5,5	1,36	$187,6 \pm 1,6$	$4,8 \pm 0,3$	$20,3 \pm 1,2$
	3,86	$464,8 \pm 3,5$	$15,5 \pm 0,3$	$28,0 \pm 1,2$
hitzesterilisiert pH 7,2	1,36	$73,1 \pm 1,0$	$0,0 \pm 0,0$	n. d.
	3,86	$254,1 \pm 2,1$	$1,6 \pm 0,1$	n. d.
steril filtriert pH 7,2	1,36	$0,0 \pm 0,0$	n. d.	n. d.
	3,86	$1,5 \pm 0,2$	n. d.	n. d.

n. d. nicht detektiert

Die höchsten Gehalte an allen drei 1,2-Dicarbonylverbindungen sind in hitzesterilisierten PD-Lösungen mit niedrigem pH-Wert zu finden. Vergleicht man Hitzesterilisation mit der Sterilfiltration von PD-Lösungen, so ist ein Zusammenhang zwischen der Bildungsrate an α -Dicarbonylverbindungen und einer Temperaturbehandlung ersichtlich.

Die Bildung von 3-Desoxyglucosulose im Laufe der Maillard-Reaktion ist im Kapitel 2.1.2 beschrieben. Einen weiteren Bildungsweg für 3-DG stellt der Polyol Bildungsweg dar (Abb. 2.1.3.2-1).

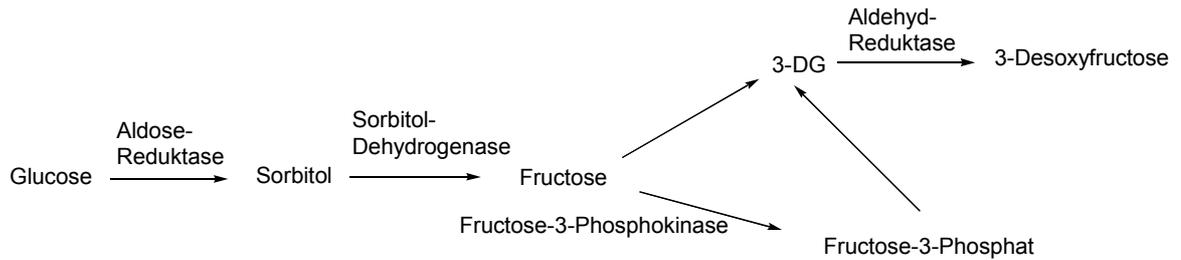


Abbildung 2.1.3.2-1: Bildung von 3-Desoxyglucosulose auf dem Polyol Bildungsweg (Niwa, 1999)

3-Desoxyglucosulose wird enzymatisch durch die Aldehyd-Reduktase zu 3-Desoxyfructose abgebaut. Im Urin gesunder Menschen kann keine 3-Desoxyglucosulose nachgewiesen werden. Jedoch ist sowohl der Metabolit des 3-DG, die 3-Desoxyfructose, als auch das 3-DG selbst in Plasma bei Diabetes mellitus-Patienten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen worden (Niwa, 1999; Beisswenger et al., 1999 und 2001; Yamada et al., 1994; Tsukushi et al., 2002). Die Ursache dafür ist noch nicht vollständig geklärt. 3-DG wirkt inhibierend auf Hexokinase und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, Enzyme des Glucose Metabolismus, so dass die Aufnahme der Glucose in die Leber durch erhöhte Gehalte an 3-DG verhindert wird. Dies deutet auf den direkten Zusammenhang zwischen dem 3-DG-Gehalt im Körper und Diabetes hin (Niwa, 1999).

Die Bildung von MGO *in vivo* erfolgt über das Glyceraldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat (Abb. 2.1.3.2-2). MGO wird über die Glyoxalase I und II zu D-Lactat (**25**) (Thornalley, 1993) und über Reduktase zu Acetol (**26**) entgiftet (Sato et al., 1980; Beisswenger et al., 1999). Die Entgiftung von Glyoxal (GO) erfolgt über die gleiche cytosolische Glyoxalase wie das MGO und wird zu Glycolat abgebaut (Shangari et al., 2004).

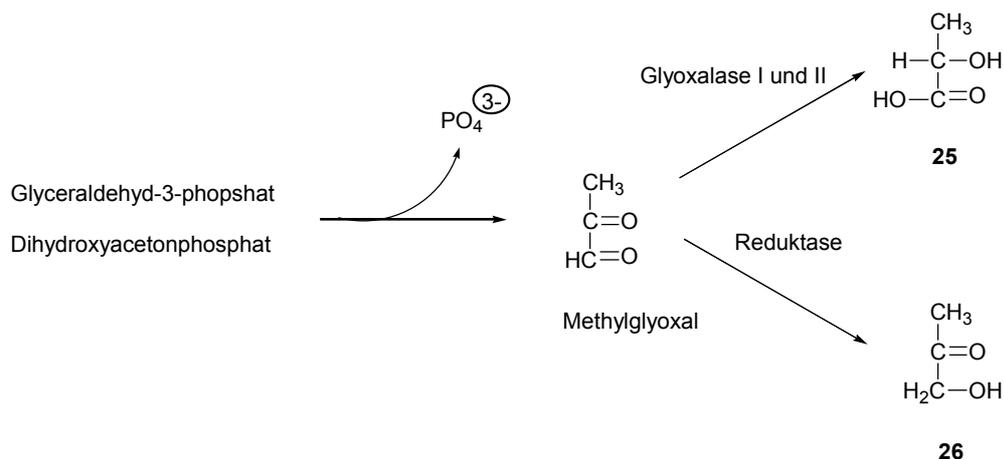


Abbildung 2.1.3.2-2: Bildungs- und Entgiftungsmechanismus von Methylglyoxal (Beisswenger et al., 1999); D-Lactat (25); Acetol (26)

2.1.3.3 Physiologische Folgen

Methylglyoxal gilt als mutagene und kanzerogene Verbindung, sowie auch wie die anderen Glucoseabbauprodukte, vor allem Carbonylverbindungen, als cytotoxisch (Nagao et al., 1986; Wieslander et al., 1995; Okabe et al., 2004).

Nagao et al. (1986) wiesen die kanzerogenen Eigenschaften des MGO im Versuch mit Ratten nach, wobei eine Tumorbildung durch Zufütterung von MGO über einen Zeitraum von 20 Monaten induziert wurde. Weiterhin zeigte sich das MGO als mutagen für *Salmonella typhimurium*.

Aufgrund der in Tabelle 2.1.3.2-2 aufgeführten, unerwartet hohen Gehalte an Dicarbonylverbindungen in hitzesterilisierten PD-Lösungen wurden diese auf die Cytotoxizität geprüft. Dazu wurden sowohl die einzelnen Verbindungen als auch die PD-Lösungen gegen L-929 Fibroblasten von Mäusen getestet (Wieslander et al., 1995). Die ICG 20 % und ICG 50 % Werte (inhibition of the cellgrowth) sind in Tabelle 2.1.3.3-1 dargestellt. ICG 20 % bzw. ICG 50 % Wert ist die Konzentration des Stoffes, die notwendig ist, um 20 bzw. 50 % der Zellen zu töten.

Tabelle 2.1.2.3-1: ICG 20 % und ICG 50 % Werte für Methylglyoxal (MGO), Glyoxal (GO) und 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) (L-929 Fibroblasten von Mäusen) (Wieslander et al., 1995)

	MGO [$\mu\text{mol/l}$]	GO [$\mu\text{mol/l}$]	HMF [$\mu\text{mol/l}$]
ICG 20 % (L-929)	99 ± 11	514 ± 54	689 ± 61
ICG 50 % (L-929)	164 ± 19	903 ± 81	1355 ± 101

Die *in vivo* und in Lebensmitteln vorkommende Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen liegen weit unter diesen Werten.

In einem weiteren *in vitro*-Test wurde die Cytotoxizität von GO, MGO und 3-DG gegenüber von HPMC-Zellen (humane peritoneale Mesothelzellen) getestet (*Okabe et al., 2004*). Mesothelzellen gehören zur ersten Zellschicht in der Bauchhöhle, die mit PD-Lösungen in Kontakt kommen. *Okabe et al. (2004)* haben die HPMC 7 h und 10 h lang mit α -Dicarbonylverbindungen inkubiert und das Wachstum der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Tabelle 2.1.2.3-2 zusammengefasst. Ersichtlich ist, dass Methylglyoxal höheres cytotoxisches Potential aufweist als Glyoxal oder 3-Desoxyglucosulose.

Tabelle 2.1.2.3-2: Wachstum von HPMC nach 7- und 10-stündiger Inkubation mit Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO) und 3-Desoxyglucosulose (3-DG)

	2,8 mmol/ l MGO	1,5 mmol/ l GO	46,5 mmol/ l 3-DG
HPMC [%] 7 h	64,6 ± 6,7	(98)	40,6 ± 3,7
HPMC [%] 10 h	59,1 ± 2,6	(92)	24,1 ± 4,3

Diese Tests beweisen zwar, dass 1,2-Dicarbonylverbindungen ab einer bestimmten Konzentration zelltoxisch wirken können, jedoch sind diese Ergebnisse in Relation zu *in vivo* und in Lebensmitteln gemessenen Gehalten von keiner großen Bedeutung (vgl. Tabelle 2.1.3.1-1 und Tabelle 3.1.3.2-1). Toxische Effekte ausgehend von in Lebensmitteln vorkommenden Gehalten an MGO oder 3-DG sind somit nicht zu erwarten.

Eine neuere Studie zeigt die cytotoxische Wirkung von Maillard-Produkten, die als Folge des Kohlenhydratabbaus mit einer 1,2-Dicarbonyl-, Furanon- oder Pyranonstruktur entstehen, gegen Tumorzelllinien LXFL529L (large cell lung carcinoma), GXF251L (gastric carcinoma) und CXF97 (colorectal carcinoma) (*Marko et al., 2003*). Von mehreren getesteten Maillard-Verbindungen gegen diese drei Zelllinien zeigte das maximale Hemmungspotential gegenüber den Tumorzellen eine Verbindung mit der 1,2-Dicarbonylfunktion. Diese wies ICG 50 % Werte von $8 \pm 2 \mu\text{mol/l}$ für LXFL529L, $9 \pm 1 \mu\text{mol/l}$ für CXF94L und $8 \pm 8 \mu\text{mol/l}$ für GXF251L auf.

2.2 Lactoseabbau im Laufe der Maillard-Reaktion

2.2.1 Lactoseabbau im alkalischen Milieu

Lactose (4-O- β -Galactopyranosyl-D-glucopyranose) (Abb. 2.2.1-1, 27) ist das Hauptkohlenhydrat der Milch, bestehend aus einem Molekül Galactose, welches über eine 1,4-

glycosidische Bindung mit einem Molekül Glucose verknüpft ist. Lactose kommt mit 4 bis 6 % im Durchschnitt in der Milch vor (*Belitz et al., 2001; Berg, 1993*).

Im wässrigen alkalischen Milieu finden schon bei Raumtemperatur Umlagerungsreaktionen statt, die auf der Einstellung eines Tautomerie-Gleichgewichtes beruhen. Die Ketose-Aldose-Isomerisierung läuft im stark basischen Milieu ab und ist unter dem Namen Lobry de Bruyn-van Ekenstein Umlagerung bekannt (*Berg, 1993*). Unter diesen Bedingungen erfolgt die Bildung eines 1,2-Endiols (**28**), welches zu den Disacchariden Epilactose (**29**) und Lactulose (**30**) isomerisiert. Andererseits kann das 1,2-Endiol wie in 2.1.2.1 beschrieben mit Aminosäuren weiter reagieren oder Abbaureaktionen im Rahmen der Karamellisierung eingehen.

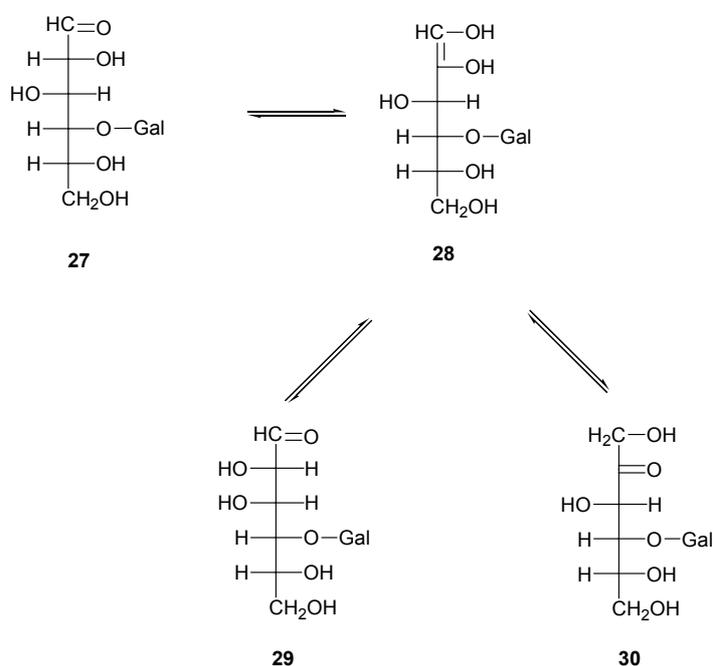


Abbildung 2.2.1-1: Lobry de Bruyn-van Ekenstein Umlagerung von Lactose (**27**) zu Epilactose (**29**) und Lactulose (**30**)

Lactulose ist ein Produkt der Hitzbehandlung von Milch und wird als Marker für die Wärmeeinwirkung verwendet. In Rohmilch ist Lactulose nicht nachweisbar. Ihr Gehalt steigt mit zunehmender Temperatur, so dass pasteurisierte Milch < 1 mg/ 100 g, UHT-Milch 5- 60 mg/ 100 g und Sterilmilch 45- 130 mg/ 100 g Lactulose enthält (*Römpp, 1997; Claeys et al., 2004*).

Moreno et al. (2003) führten eine Modellstudie durch, um den Abbau von Lactose im alkalischen Milieu unter Hochdruckbehandlung zu untersuchen. Sie wiesen nach, dass eine Isomerisierung unabhängig vom Puffersystem stattfindet und lediglich vom pH-Wert abhängig ist. Eine Bildung von Lactulose, Epilactose und Galactose konnte nachgewiesen

werden, jedoch stellten sie fest, dass eine Bildung von diesen drei Lactoseabbauprodukten unter Hochdruck (400 MPa) und 60 °C Temperatur geringer ausfällt im Vergleich zu einer Hitzebehandlung beim atmosphärischen Druck. Gleichzeitig konnte eine Verminderung der Bräunungsreaktionen verzeichnet werden, so dass man eine solche Hochdruckbehandlung in Betracht ziehen kann, wenn bestimmte Maillard-Produkte unerwünscht sind, oder im geringeren Maße vorhanden sein sollen.

Adachi et al. (1959) untersuchten den Lactoseabbau während der Hitzebehandlung von Milch. Sie schlugen einen Lactoseabbau zu Lactulose, über eine Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein oder Amadori Umlagerung vor. In stark erhitzter Milch identifizierten sie Glucose, Tagatose, Galactose und Lactulose mittels Dünnschichtchromatographie und isolierten gleichzeitig Galactose und Lactulose (*Adachi et al., 1958*). *Corbett et al. (1953)*, sowie *Whistler et al. (1962)* postulierten einen ähnlichen Abbaumechanismus der Lactose im stark Alkalischen.

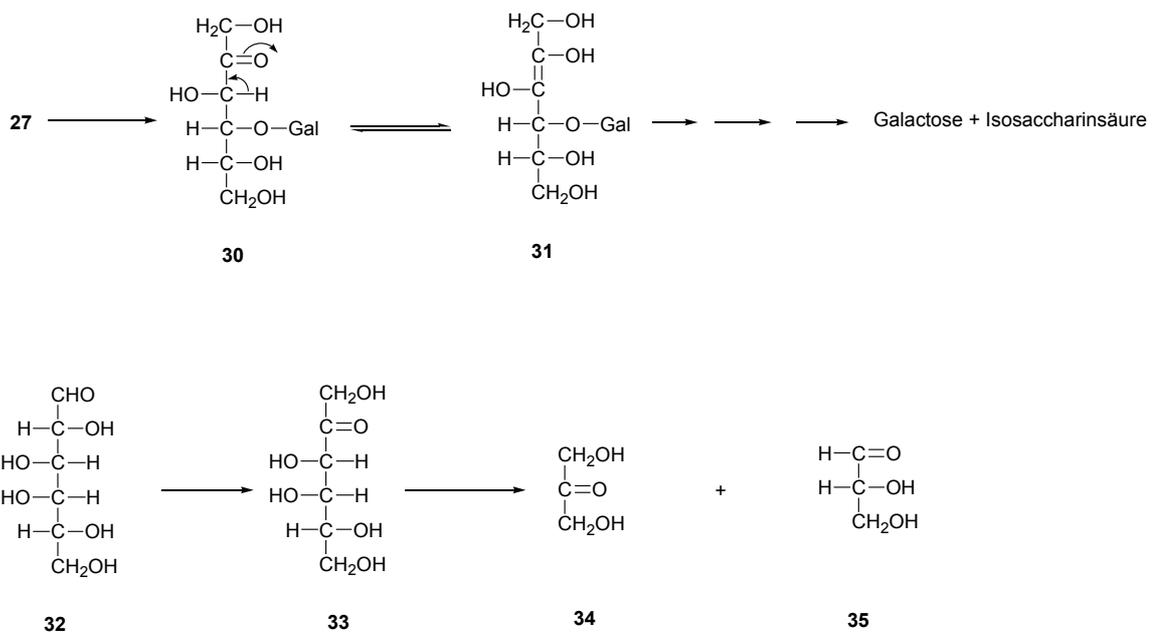


Abbildung 2.2.1-2: Lactoseabbau zu Galactose (32) und Isosaccharinsäure im stark alkalischen Milieu; Folgereaktionen der Galactose zu Tagatose (33) mit anschließender Fragmentierung zu 1,3-Dihydroxy-propan-2-on (34) und 3-Dihydroxy-propionaldehyd (35)

Wie in Abb. 2.2.1-2 gezeigt, werden Galactose und α - und β -Isosaccharinsäure aus Lactulose (30) über die Ausbildung eines 2,3-Endiols (31) gebildet. Galactose (32) epimerisiert andererseits zu Tagatose (33), die Fragmentierungsreaktionen unterliegt und zur Ausbildung der Dicarbonylverbindungen 1,3-Dihydroxy-propan-2-on (34) und 2,3-Dihydroxy-propionaldehyd (35) führt (Abb. 2.2.1-2) (zusammengefasst in *Berg, 1993*).

2.2.2 Bildung von C5-Carbonylverbindungen

2.2.2.1 Bildung von 3-Desoxypentulose (3-DP)

3-Desoxypentulose (3-DP) gehört zu den Minorbestandteilen des Lactoseabbaus in Milch und Milchprodukten, sowie des Abbaus 1,4-glycosidisch verknüpfter Disaccharide. Sie wird im alkalischen Milieu sowohl als Produkt der Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein Umlagerung als auch als Produkt der Maillard-Reaktion gebildet (*Troyano et al., 1994*). *Troyano et al. (1994)* wiesen den Zusammenhang zwischen der Bildung von 3-Desoxypentulose und dem a_w -Wert bzw. der Lagerungszeit in Milchpulver nach. Mit zunehmender Lagerung und zunehmendem a_w -Wert nimmt auch der Gehalt an 3-DP zu. Sie stellten weiterhin fest, dass in frischen und pasteurisierten Milchproben keine 3-Desoxypentulose nachweisbar war (*Troyano et al., 1992*). In sterilisierten Milchproben konnten $2,7 \pm 1,85$ mg 3-DP/ 100 ml Milch bestimmt werden (*Troyano et al., 1996*). Einen Gehalt von 250 mg/l bestimmten sie nach der Erhitzung einer Milchprobe für 20 min bei 120 °C. Der Gehalt an 3-Desoxypentulose nimmt mit der zunehmenden Temperatur und Inkubationsdauer immer weiter zu, so dass er somit als ein weiteres Qualitäts- und Unterscheidungsmerkmal für die unterschiedliche Hitzebehandlung von Milch herangezogen werden kann. Der Bildungsmechanismus von 3-Desoxypentulose nach *Berg (1993)* sowie *Brands & van Boekel (2001)* ist in Abb. 2.2.2.1-1 dargestellt. Zur Bildung von 3-Desoxypentulose isomerisiert Lactose (**27**) zu Lactulose (**30**), welche über das 2,3-Endiol (**4**) (vgl. 2.1.2) zu 4-Desoxyglucoson (**12**) reagiert. Nach der Abspaltung von Galactose und Eliminierung von C1-Atom unter alkalischen Bedingungen kommt es zur Bildung von Ameisensäure (**36**) (vgl. 2.1.3) und 3-Desoxypentulose (**37**).

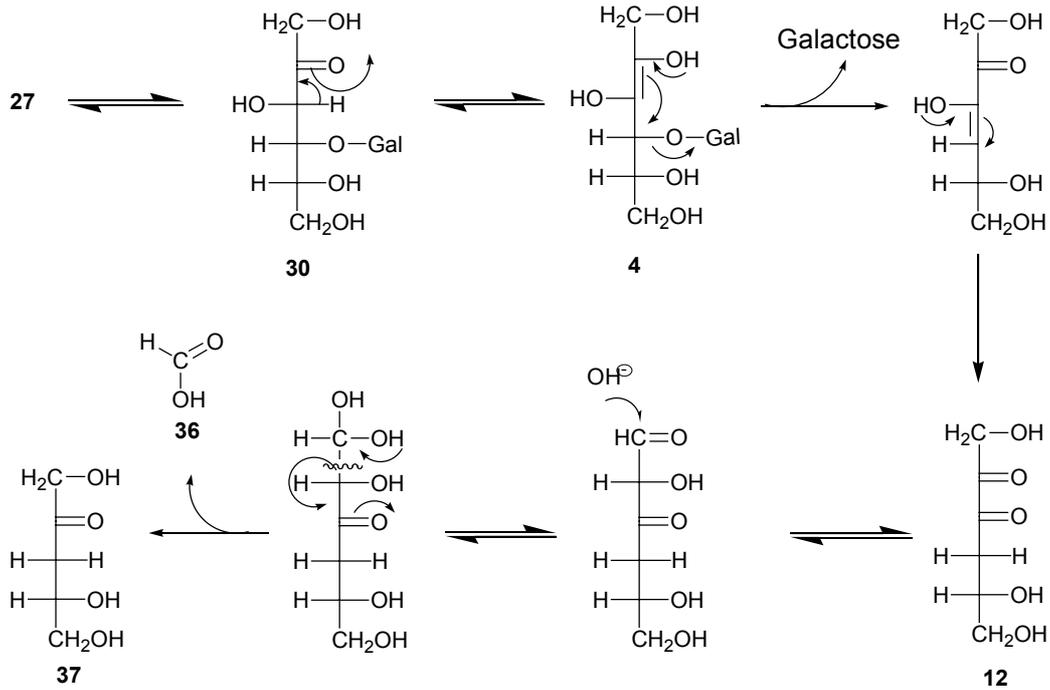


Abbildung 2.2.2.1-1: Bildungsmechanismus von 3-Desoxypentulose (3-DP) (37) ausgehend von Lactose (27)

2.2.2.2 Bildung von 3-Desoxypentulose (3-DPs)

Unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion bzw. der Karamellisierung im wässrigen Milieu ist die 3-Desoxypentulose (3-DPs) als das Hauptabbauprodukt aus der Umsetzung von Maltose identifizierbar. In Modelluntersuchungen zum Bildungsmechanismus von 3-DPs wiesen *Hollnagel & Kroh (2002)* nach, dass 3-Desoxypentulose aus Hexosen wie z.B. D-Glucose nicht gebildet wird. 3-Desoxypentulose ist eine 1,2-Dicarbonylverbindung, die für den Abbau der Di- und Oligosaccharide charakteristisch ist. Die glycosidische Bindung scheint eine entscheidende Rolle im Abbauweg der Oligosaccharide und Bildung von 3-Desoxypentulose zu haben. Ein möglicher Bildungsweg nach *Kroh et al. (2001)* ist in Abb. 2.2.2.2-1 dargestellt. Die Autoren schlagen erst eine vinyloge β -Eliminierung der D-Glucose aus dem 2,3-Endiol der Maltose (4) und eine Bildung von 1-Amino-1,4-didesoxyoson (38) vor. Keto-Enol-Tautomerie von 38 führt zur Bildung einer 1-Imino-3-Keto-Struktur, die in einem Retro-Claisen Esterkondensationsschritt zu Ameisensäure (36) und einem Pentosederivat (39) abgebaut wird. Aus 39 wird durch eine Oxidation die 3-Desoxypentulose (40) gebildet.

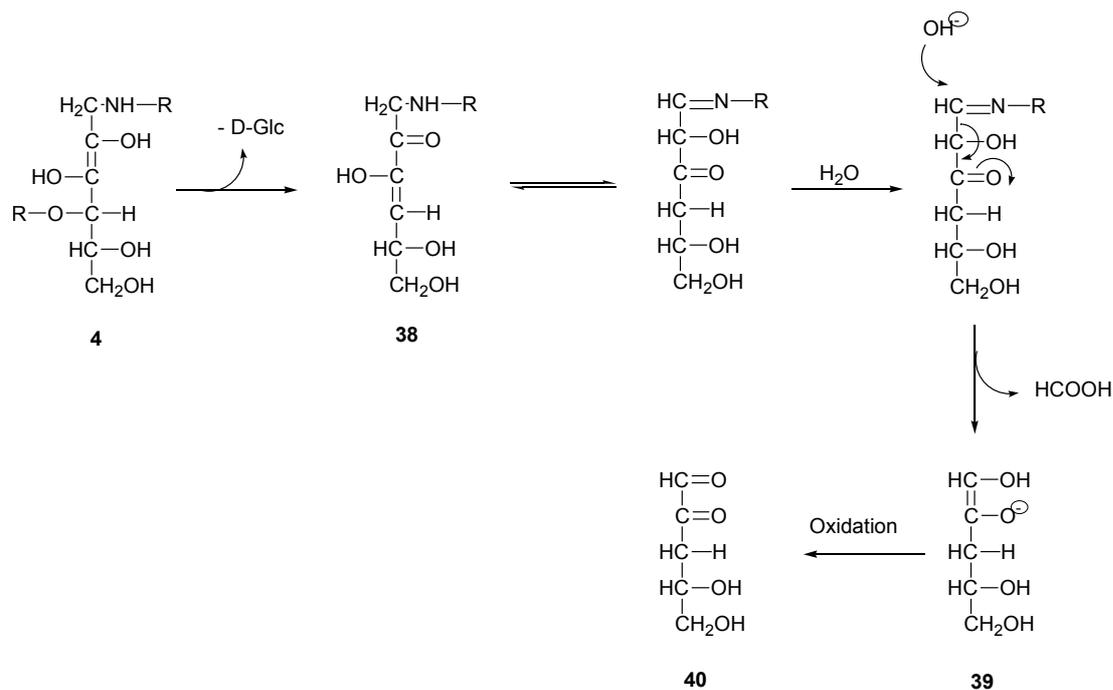


Abbildung 2.2.2.2-1: Bildungsmechanismus von 3-Desoxypentose (**40**) ausgehend von Maltose, die durch die Abspaltung von D-Glucose zur Bildung von 1-Amino-1,4-dideoxyoson (**38**) führt, welches zu einem Pentosederivat (**39**) und Ameisensäure weiter reagiert

Findet die Reaktion unter wasserfreien Bedingungen statt, so erscheint die 1,4-Dideoxyhexose (1,4-DDH) als das Hauptprodukt aus dem Maltoseabbau (*Hollnagel & Kroh, 2002; Kroh et al., 2001*). Im wässrigen Milieu konnte sie dagegen nicht nachgewiesen werden. *Kroh et al. (2001)* postulierten einen „peeling off“-Mechanismus zur Bildung von 1,4-DDH. Demnach erfolgt ein Abbau der Maltooligo- oder Maltopolysaccharide stufenweise vom reduzierenden Ende des Kohlenhydrates über eine 2,3-Endiolstruktur, welche durch die β-Eliminierung in einem Maltooligosaccharid und 1-Amino-1,4-dideoxyhexose (**38**), einem Intermediat der 1,4-DDH resultiert. Wie in Abb. 2.2.2.2-1 dargestellt, wird die Reaktion in Abwesenheit von Wasser zugunsten der 1,4-DDH gelenkt und der Schritt zur Ausbildung der 1-Imino-3-Keto-Struktur unterdrückt.

2.3 Beteiligung von Arginin an der Maillard-Reaktion

2.3.1 Reaktionen der Guanidinogruppe mit Aldehyden und Diketonen

Im Laufe der Maillard-Reaktion wird neben der ϵ -Aminogruppe des Lysins auch die Guanidino-Gruppe des Arginins modifiziert. Schon *Mohammad et al. (1949)* beobachteten eine Verringerung des verfügbaren Arginins während der Erhitzung von Proteinen in Anwesenheit von Glucose. Die Guanidinogruppe der Arginylreste im Proteinverband kann durch Diketone und bifunktionelle Aldehyde modifiziert werden (*Patthy & Smith, 1974*). Arginin spielt eine bedeutende Rolle in der Aktivität von Enzymen wie Ribonuklease, Carboxypeptidase A, Malatdehydrogenase und Alkoholdehydrogenase (*Patthy & Smith, 1974a*). Durch gezielte Modifizierung der Guanidinoseitenkette kann ein tryptischer Verdau an Argininseitenketten im nativen Protein verhindert werden und auf Lysinreste gelenkt werden. *Toi et al. (1966)* setzten Arginin mit 1,2-Cyclohexandion (CHD) unter stark alkalischen Bedingungen zum N-5-(4-Oxo-1,3-diazospiro[4.4]non-2-yliden)-L-arginin um (Abb. 2.3.1-1, **41**). *Patthy & Smith (1974a)* stellten in ihren Untersuchungen fest, dass alle 11 Argininreste des Lysozyms mit CHD reagieren, was zu einer Teilinaktivierung des Enzyms führt, die jedoch reversibel ist. Unter milden Reaktionsbedingungen bei 25 °C und pH-Wert von 7 bis 8 reagiert Arginin mit zwei Molekülen Phenylglyoxal zu Di-(phenylglyoxal)-N- α -acetylarginin (**42**) (*Takahashi, 1968*). Es konnte auch gezeigt werden, dass Phenylglyoxal selektiver und schneller mit der Guanidinoseitenkette reagiert als Glyoxal oder Methylglyoxal. Im sauren Milieu (10 N HCl, 25 °C) wird aus Arginin mit Malonaldehyd δ -N-(2-Pirimidyl)-L-ornithin gebildet (**43**) (*King et al., 1966*). **43** kann auch bei proteingebundenem Arginin gebildet werden, wodurch das so modifizierte Arginin im Proteinverband nicht mehr durch Trypsin hydrolysierbar ist (*King et al., 1966*). Mit 2,3-Butandion reagiert Arginin zu di- und trimeren Produkten, welche zum Teil im Proteinverband irreversibel verändert sind (**44**) (*Riordan, 1973; Yankeelov et al., 1970*). *Lo et al. (1994)* zeigten, dass Methylglyoxal (MGO) in humanem Serumalbumin (HSA) bevorzugt mit Guanidinoseitenketten des Arginins reagiert. Das peptidgebundene Derivat aus dieser Reaktion (**45**) konnte isoliert und identifiziert werden. Wie in 2.1.3 angedeutet, reagiert MGO bevorzugt mit Arginin-, Lysin- und Cysteinresten im Proteinverband. Das MGO modifiziert BSA (bovinen Serumalbumin), Ribonuklease A, Lysozym, Kollagen, sowie eine Reihe verschiedener Enzyme, die dadurch inaktiviert werden (zusammengefasst in *Lo et al., 1994*).

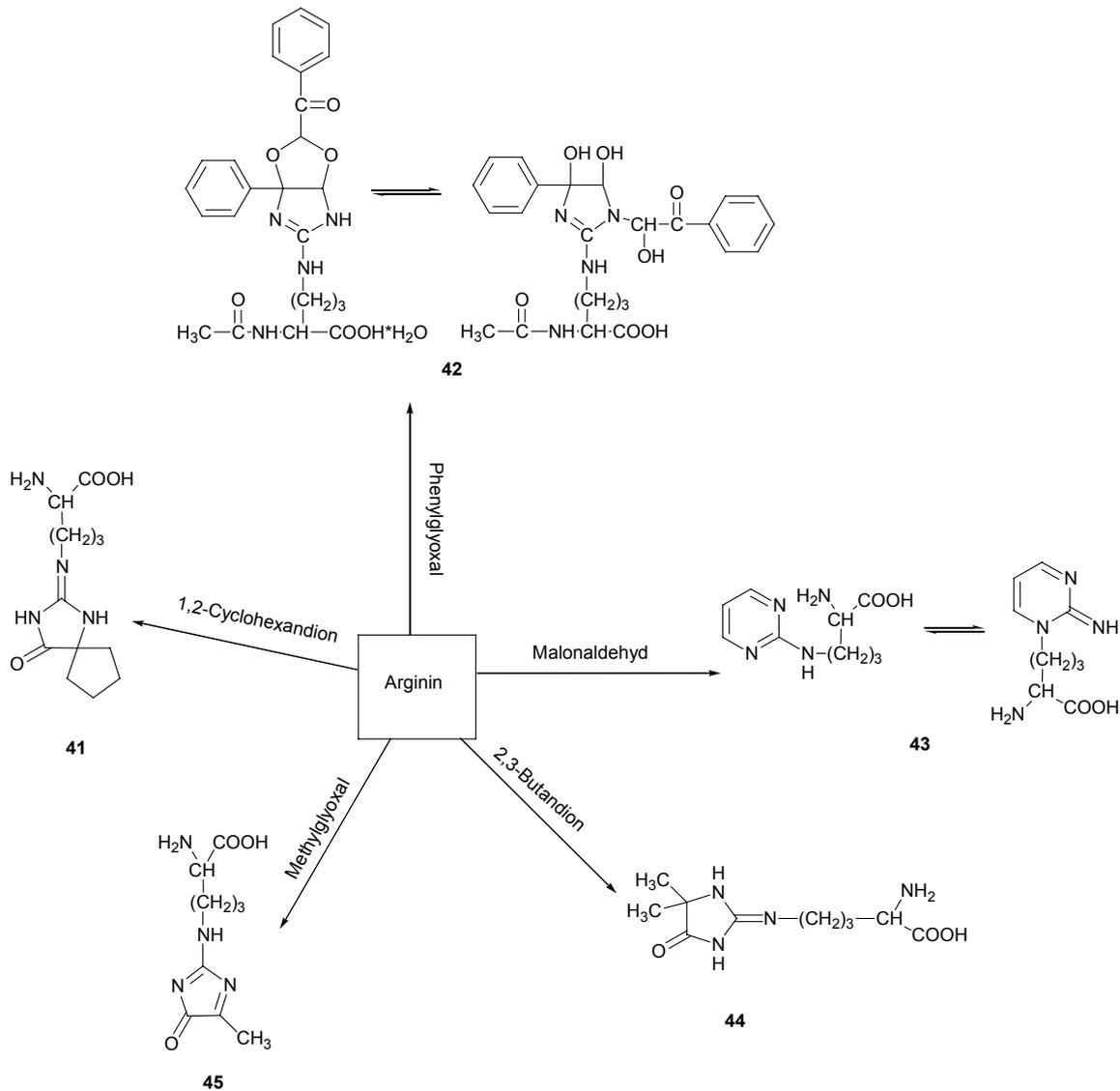


Abbildung 2.3.1-1: Argininderivate gebildet in Modellansätzen: **41** N-5-(4-Oxo-1,3-diazospiro [4.4]non-2-yliden)-L-arginin (Toi et al. 1966); **42** di-(Phenylglyoxal)-N- α -acetylarginin (Takahashi, 1968); **43** δ -N-(2-Pyrimidinyl)-L-ornithin (King, 1966); **44** 4-Dimethyl-5-oxo-imidazolin (Riordan, 1973); **45** 5-Methylimidazol-4-on (Lo et al., 1994)

2.3.2 Argininderivatisierung im Laufe der Maillard-Reaktion

Obwohl es sehr lange bekannt ist, dass Arginin sowohl während der Lagerung, Erhitzung oder Herstellung von Lebensmitteln, als auch *in vivo* modifiziert wird, sind nur wenige Verbindungen aus dieser Umsetzung in Lebensmitteln quantifiziert worden. Henle et al. (1994) gelang es, das Ornithinoimidazolinon (**46**), welches aus der Reaktion zwischen Arginin und Methylglyoxal resultiert, als proteingebundenes Argininderivat in Backwaren und geröstetem Kaffee zu bestimmen. Die Derivatisierung des Arginins betrug hierbei bis zu 30 % im stark gerösteten Kaffee. Als freie Aminosäure konnte Argpyrimidin (**47**), ein

weiteres Reaktionsprodukt aus Arginin und Methylglyoxal, in Bier und Malz bestimmt werden (*Glomb et al., 2001*). Weitere Studien zeigten, dass diese Reaktion auch *in vivo* stattfindet. Argpyrimidin wurde als fluoreszierendes Hauptprodukt in HSA identifiziert (*Shipanova et al., 1997*). *Oya et al. (1999)* wiesen Argpyrimidin in der Niere von Diabetes-Patienten nach. Sie konnten ein weiteres nicht fluoreszierendes Argininderivat identifizieren, welches aus der Reaktion von Guanidinogruppe mit zwei Molekülen Methylglyoxal gebildet wird (**48**). Glyoxal reagiert mit Arginin zum Glarg (**49**) (*Schwarzenbolz et al., 1997*). Glarg und das 2-N- α -Benzoyl-N- δ -ornithylamid)-5,6a-di(2,3,4-trihydroxybutyl)-5,6-dihydroxydehydro-furo- [2,3d]imidazol (**50**), welches aus 3-Desoxyglucosulose und Arginin entsteht (*Hayase et al., 1997*), wurden bisher nur in Modellansätzen identifiziert. Aus der Umsetzung von 3-Desoxyglucosulose mit Arginin sind einige weitere nicht fluoreszierende Imidazolone bekannt (*Hayase et al., 1995*). *Sopio & Lederer (1995)* setzten N,N-Dimethylguanidin und N-Methylguanidin als Modelle für Kreatin, Kreatinin und proteingebundenes Arginin mit 3-Desoxypentosulose (3-DPs) um. Sie identifizierten zwei Produkte, die jeweils in zwei diastereomeren Formen vorkamen, (**51**) 4-(2,3-Dihydroxypropyl)-2-N-methylamino-2-imidazolin-5-on und (**52**) 4-Hydroxy-5-(2,3-dihydroxypropyl)-2-(N,N-dimethylamino)-5H-imidazol.

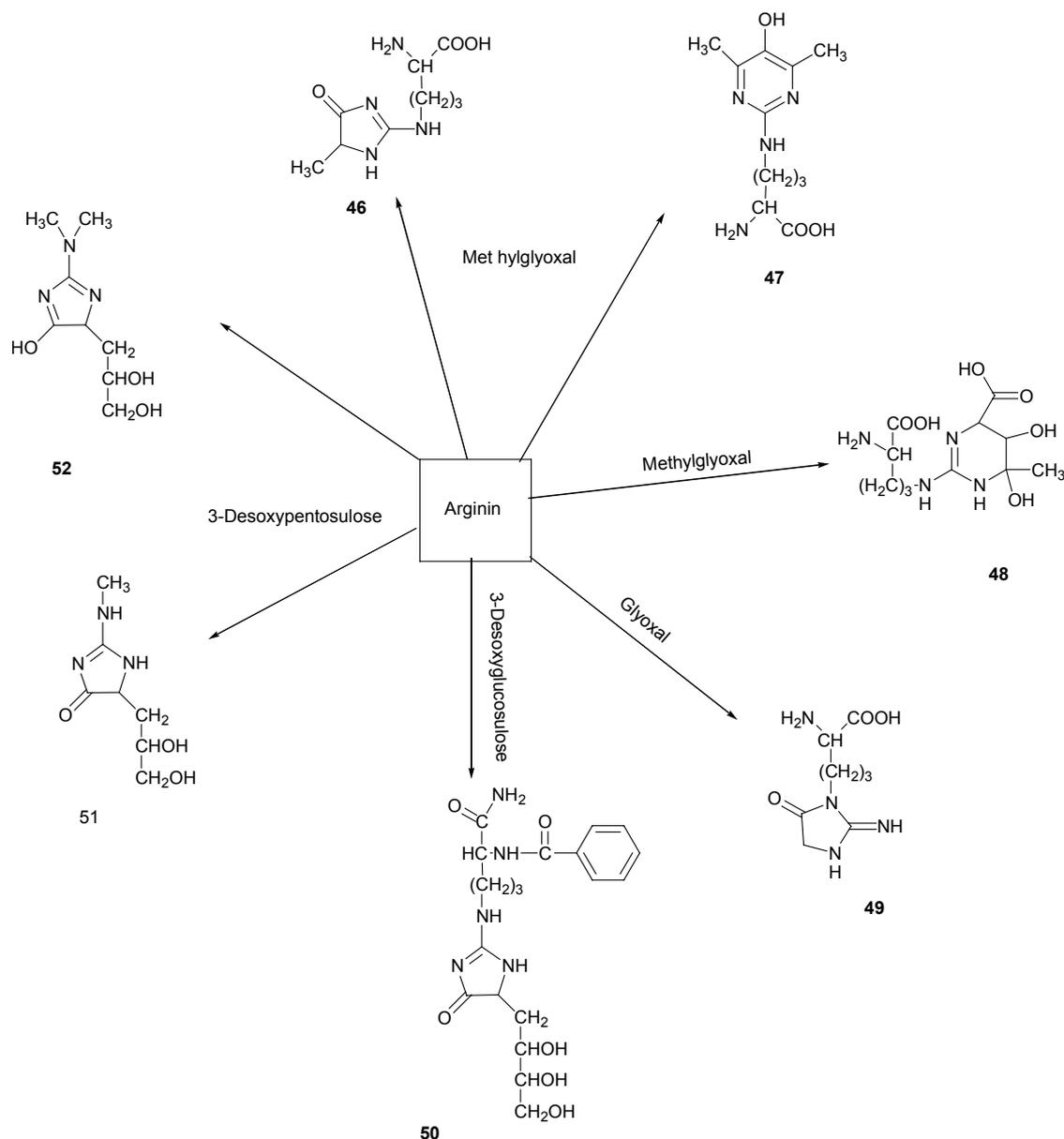
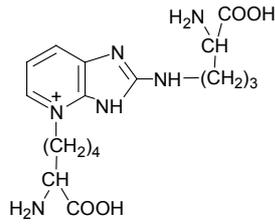


Abbildung 2.3.2-1: Reaktionsprodukte der Argininderivatisierung mit 1,2-Dicarbonylverbindungen **46** N-δ-(5-Methyl-4-oxo-5-hydroimidazol-2-yl)-L-ornithin (Henle *et al.*, 1994); **47** N-δ-(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)-L-ornithin (Argpyrimidin) (Glomb *et al.*, 1997); **48** Tetrahydropyrimidin (Oya *et al.*, 1999); **49** 5-(2-Imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)-norvalin (Glarg) (Schwarzenbolz *et al.*, 1997); **50** 2-N-α-Benzoyl-N-δ-ornithylamid)-5,6-di(2,3,4-trihydroxybutyl)-5,6-dihydroxydehydrofuro[2,3d]imidazol (Hayase *et al.*, 1997); **51** 4-(2,3-Dihydroxypropyl)-2-N-methylamino-2-imidazolin-5-on (Sopio & Lederer, 1995); **52** 4-Hydroxy-5-(2,3-dihydroxypropyl)-2-(N, N-dimethylamino)-5H-imidazol (Sopio & Lederer, 1995)

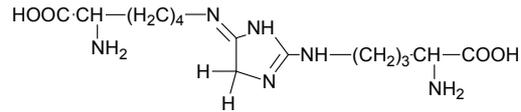
2.3.3 Quervernetzungsreaktionen des Arginins

Zu den wichtigsten Proteinveränderungen, die im Laufe der Maillard-Reaktion stattfinden und im direkten Zusammenhang mit den Alterungsprozessen stehen, gehören Proteinquervernetzungsreaktionen, die untereinander in der fortgeschrittenen Phase der

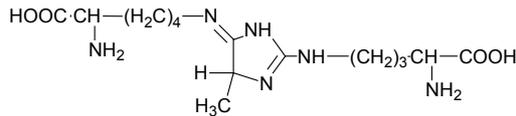
Maillard-Reaktion ablaufen. Die in der frühen und fortgeschrittenen Phase gebildeten 1,2-Dicarbonyl-Verbindungen reagieren mit Aminen und führen somit durch inter- und intramolekulare Proteinquervernetzungsreaktionen zur Ausbildung von sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGEs), die im Gewebe z.B. an Kollagen, Augenlinsenprotein und anderen Proteinen gespeichert werden (*Biemel et al., 2002*). Während der Alterung sinkt einerseits die Löslichkeit und die proteolytische Verdaubarkeit der Proteine. Andererseits lassen sie sich schneller denaturieren (*Sell & Monnier, 1989*). Quervernetzungsreaktionen beeinflussen auch ernährungsphysiologische und funktionelle Eigenschaften von Lebensmitteln (*Reihl et al., 2003*). Pentosidin (Abb. 2.3.2-1, **53**), eine Crosslink-Aminosäure, in der Arginin und Lysin über eine Pentose vernetzt sind, wurde in Kollagen nachgewiesen und anschließend isoliert (*Sell, Monnier, 1989*). Die Synthese und Strukturaufklärung von Pentosidin wurde von *Sell & Monnier (1989)* in einem Modellansatz aus Ribose, Lysin und Arginin erbracht. *Henle et al. (1997)* gelang es, Pentosidin in Lebensmitteln nachzuweisen und seinen Gehalt zu bestimmen (vgl. 2.3.4). Weitere Lysin-Arginin-Quervernetzungsprodukte wurden als GODIC (**54**) und MODIC (**55**) im Inkubationsansatz Glyoxal bzw. Methylglyoxal mit BSA unter physiologischen Bedingungen identifiziert (*Lederer et al., 1999b*). Da GODIC und MODIC auch in Inkubationsansätzen D-Glucose und BSA nachgewiesen wurden, spielen sie vermutlich auch eine wichtige Rolle als Maillard-Produkte sowohl *in vivo* als auch in Lebensmitteln (*Lederer et al., 1999b*). Weiteres Produkt der Umsetzung von Glucose mit BSA unter physiologischen Bedingungen stellt Glucosepan (**56**) dar (*Lederer et al., 1999a, 1999b; Lederer et al., 1998*). Glucosepan wurde als Haupt-Crosslink in HSA und in Augenlinsenproteinen nachgewiesen (*Biemel et al., 2002*). Außerdem konnten *Biemel et al. (2002)* hierbei auch GODIC, MODIC und DOGDIC (**57**) nachweisen. Im Modellansatz aus 3-DG bzw. D-Glucose und BSA wurde auch DOPDIC (**58**) identifiziert, welches aber als Minorprodukt gebildet wird, und aus quantitativer Sicht bisher von geringer Bedeutung zu sein scheint (*Biemel et al., 2001*).



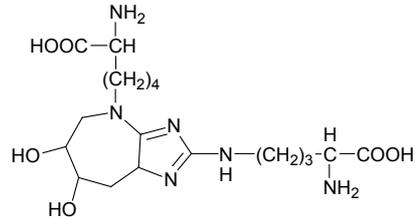
53



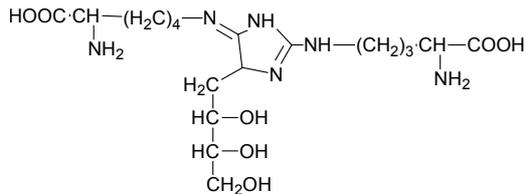
54



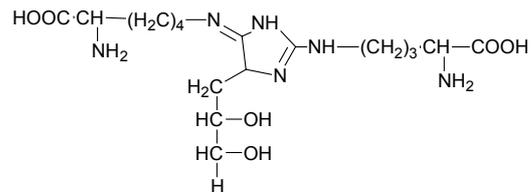
55



56



57



58

Abbildung 2.3.3-1: Proteinquervernetzungsprodukte des Arginins: **53** Pentosidin (*Sell & Monnier, 1989*); **54** GODIC (*Lederer et al., 1999b*); **55** MODIC (*Lederer et al., 1999b*); **56** Glucosepan (*Lederer et al., 1999b, 1999a; Lederer et al., 1998*); **57** DOGDIC (*Biemel et al., 2002*); **58** DOPDIC (*Biemel et al., 2001*)

2.3.4 Konsequenzen der Argininderivatisierung für Lebensmittel

Anders als bei Lysin sind die meisten Derivate des Arginins, die während der Maillard-Reaktion gebildet werden, und bislang nur in Modellansätzen isoliert und identifiziert wurden, in Lebensmitteln bisher nicht nachgewiesen worden. Als einziges proteingebundenes Argininderivat in Lebensmitteln wurde ein Imidazolinon (Abb. 2.3.2-1, **46**) bestimmt und aus Lebensmitteln isoliert (*Henle, 1994*). Es wurden Gehalte in verschiedenen Laugenbackwaren von 900 bis 1300 mg/ kg Protein bestimmt. Im Fall des Imidazolinons konnte eine Argininderivatisierung durch Methylglyoxal zwischen 20 und 30 % errechnet werden. Als freie Aminosäure wurde Argpyrimidin (Abb. 2.3.2-1, **47**) in verschiedenen Bieren bis zu 25 nmol/ l bestimmt (*Glomb et al., 2001*). *Glomb et al. (2001)* wiesen nach, dass Argpyrimidin in

Modellansätzen mit Methylglyoxal bevorzugt gebildet wird, jedoch gelang es bisher nicht, es als proteingebundene Aminosäure in anderen proteinreichen Lebensmitteln zu bestimmen.

Die erste Crosslink-Aminosäure des Arginins, die in Lebensmitteln quantifiziert wurde, ist Pentosidin. *Henle et al. (1997)* zeigten die Abhängigkeit des Pentosidgehaltes von der Temperatur. In Rohmilch, pasteurisierter und UHT-Milch konnte kein Pentosidin nachgewiesen werden. Die einzelnen Werte sind der Tabelle 2.3.4-1 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass Pentosidin eine untergeordnete Rolle spielt, wenn es um die Derivatisierung des Arginins in Lebensmitteln geht. Betrachtet man Quervernetzungsreaktionen im allgemeinen, so stellt man fest, dass auch hier Pentosidin eine Minorkomponente der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion darstellt. *Biemel et al. (2001)* gelang es GODIC, MODIC, DOGDIC und Glucosepan in einigen Lebensmitteln zu bestimmen (Tabelle 2.3.4-1). Diese Werte liegen im Durchschnitt etwas höher als die Werte für Pentosidin, sind jedoch aus quantitativer Sicht von geringer Bedeutung, da man die Gesamtderivatisierung des Arginins in Lebensmitteln damit nur zu einem unbedeutenden Teil erklären kann.

Tabelle 2.3.4-1: Crosslink-Aminosäuren des Arginins: Pentosidin, GODIC, MODIC, DOGDIC und Glucosepan in Lebensmitteln

	[mg/ kg Protein]				
	Pentosidin ¹	GODIC ²	MODIC ²	DOGDIC ²	Glucosepan ²
UHT-Milch, frisch	n.d.	-	-	-	-
UHT-Milch, 12 Wochen, 4 °C	n.d.	-	-	-	-
UHT-Milch, 12 Wochen, 20 °C	0,6	-	-	-	-
UHT-Milch, 12 Wochen, 37 °C	4,0	-	-	-	-
Sterilmilch	0,1- 2,6	-	-	-	-
Brotkruste	0,4- 2,6	-	-	-	-
Brezel	9,3- 22,8	11- 21	44- 109	8- 31	13- 47
gerösteter Kaffee	10,8- 39,9	-	-	-	-

2 Theorieteil

	Pentosidin ¹	GODIC ²	[mg/ kg Protein] MODIC ²	DOGDIC ²	Glucosepan ²
Butterkekse	-	57	151	36	16
Salzstangen	-	20	65	12	14
Eiklar (10 min, 100 °C)	-	22	60	7	15

n.d. nicht detektiert

¹ *Henle et al. (1997)*

² *Biemel et al. (2001)*

Betrachtet man die in der Literatur veröffentlichten Arbeiten zur Derivatisierung des Arginins während der Maillard-Reaktion, so kann man feststellen, dass die bisher in Lebensmitteln bestimmten Argininverbindungen den unter Umständen 30-40 % betragenden Argininabbau als Folge einer starken Hitzebehandlung nicht erklären können.

2.3.5 Physiologische Folgen

Produkte der Maillard-Reaktion werden in der Literatur oft in den Zusammenhang mit Alterungsprozessen, aber auch mit Erkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus oder Urämie gebracht (*Sell & Monnier, 1989; Nagaraj et al., 1991; Nagaraj et al., 1996; Sell et al., 2005*). Vor allem Glyoxal und Methylglyoxal reagieren mit Lysin und Arginin zu AGEs, die sich in langlebigen Proteinen wie z.B. Kollagen oder Augenlinsenprotein anreichern können und somit mit Alterungsprozessen zusammenhängen (*Padayati et al., 2001; Reihl et al., 2003*). AGEs des Lysins, wie Carboxyethyllysin (CEL), MGO-Lysin Dimer (MOLD) oder GO-Lysin Dimer (GOLD), wurden im Augenlinsenprotein nachgewiesen. Ein Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und dem Gehalt an diesen Verbindungen konnte gezeigt werden (*Padayati et al., 2001*). *Odani et al. (1998)* wiesen einen erhöhten Gehalt an GOLD und MOLD in Serumprotein von Urämie-Patienten nach.

Augenlinsenprotein bei 80-jährigen weist einen viermal höheren Gehalt an Pentosidin auf als bei 20-jährigen (*Dyer et al., 1991; Nagaraj et al., 1991*). MODIC, GODIC, DOGDIC und Glucosepan wurden *in vivo* in HSA und Augenlinsenprotein nachgewiesen und quantifiziert. Glucosepan zeigte sich als dominierende Crosslink-Verbindung der Maillard-Reaktion, die mit 42,5 pmol/ mg Protein in HSA bzw. von 132 bis 247 pmol/ mg in Augenlinsenprotein der Diabetes kranken bestimmt wurde (*Biemel et al., 2002*). Die Gehalte dieser Verbindungen sind jedoch zu niedrig, um Aussagen über den Zusammenhang zwischen Crosslink-

Verbindungen und Erkrankungen vom Typ Diabetes mellitus treffen zu können. Sie können jedoch als Marker für Alterungsprozesse herangezogen werden.

Studien zu Proteinquervernetzungsreaktionen und Alterungsvorgängen, sowie Diabetes-erkrankung zeigten, dass nur Glucosepan sowohl im Hautkollagen als auch im Augenlinsenprotein mit dem zunehmenden Alter sowie im Zusammenhang mit Diabetes melitus zunimmt. In dieser Studie wurden außer Glucosepan auch MODIC, GODIC und DOGDIC untersucht. Es wurden Gehalte an Glucosepan von 2000 pmol/ mg Kollagen bei gesunden 90 jährigen bzw. 4500 pmol/ mg Kollagen bei Diabetes-Patienten bestimmt. Eine Konsequenz dieser Quervernetzung ist eine 30- bis 45-fache Verringerung der Elastizität des Kollagens (*Sell et al., 2005*). Für andere Arginin-Lysin Crosslink-Verbindungen wie GODIC, MODIC oder DOGDIC konnten zwar höhere Gehalte bei Diabetes-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden werden. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch als zu gering, um aus den ermittelten Gehalten auf einen Zusammenhang mit der Alterung oder Diabetes melitus schließen zu können. Es wurden Gehalte an MODIC und GODIC von 30 und 15 pmol/ mg Kollagen bei 90-jährigen gefunden. DOGDIC erwies einen Gehalt von 14 pmol/ mg Kollagen unabhängig vom Alter. Das Kollagen der Diabetes-Patienten zeigte Gehalte von 55 pmol/ mg für MODIC, 27 pmol/ mg für GODIC und 32 pmol/ mg für DOGDIC. Auch hier konnte eine Zunahme an MODIC- und GODIC-Gehalt mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Der Gehalt von DOGDIC schien auch bei Diabetes-Patienten unabhängig vom Alter zu sein (*Sell et al., 2005*).

Eine mögliche Erklärung für die geringen Gehalte an Arginin-Crosslinks in langlebigen Proteinen liefert der Nachweis von Ornithin in Kollagen bzw. in Augenlinsenprotein (*Sell & Monnier, 2004*). In Säurehydrolysaten von humanen Augen- und Hautproteinen konnte eine Zunahme von Ornithin von 1 auf 15 nmol/ mg Protein verzeichnet werden bei einer Altersspanne von 10 bis 90 Jahren. Nach der enzymatischen Hydrolyse lag die Wiederfindung des Ornithins bei 78 % in Augenlinsenprotein und 90 % in Kollagen. Es wird vermutet, dass ein spontaner Abbau von AGEs des Arginins zu Ornithin *in vivo* stattfindet.

2.4 Antibakterielle Eigenschaften von Honig

2.4.1 Qualitätsanforderungen an Honig

Der Begriff Honig ist in der Honigverordnung (*HonigV, Anlage I*) definiert. „*Honig ist der natursüße Stoff, der von Honigbienen erzeugt wird, indem die Bienen Nektar von Pflanzen oder Sekrete lebender Pflanzenteile oder sich auf den lebenden Pflanzenteilen befindende*

Exkrete von an Pflanzen saugenden Insekten aufnehmen, durch Kombination mit eigenen spezifischen Stoffen umwandeln, einlagern, dehydratisieren und in den Waben des Bienenstocks speichern und reifen lassen.“ Je nach Tracht unterscheidet man Blütenhonig und Honigtau Honig, auch Waldhonig genannt. Wenn ein Honig vorwiegend aus einer Blüte beschaffen ist, spricht man von Sortenhonig (Bogdanov, 1999). Die HonigV (2004, Anlage 2) schreibt sieben Qualitätsanforderungen an Honige vor. Der Zucker- und Wassergehalt, der Gehalt an wasserunlöslichen Stoffen, die elektrische Leitfähigkeit, der Gehalt an freien Säuren, die Diastase-Zahl und der HMF-Gehalt sind gesetzlich geregelt. In der Tabelle 2.4.1-1 ist die durchschnittliche Zusammensetzung der Honige mit den entsprechenden Qualitätsanforderungen zusammengefasst (Bogdanov, 1999; Deifel, 1989).

Tabelle 2.4.1-1: Durchschnittliche Zusammensetzung der Honige mit dazugehörigen Anforderungen

Inhaltsstoff	Herkunft	Anteil im Honig	Anforderung
Wasser	Pflanze	14 - 20 %	max. 21 %
Glucose	Pflanze + Biene	25 - 35 %	Glucose + Fructose
Fructose	Pflanze + Biene	32 - 42 %	min. 65 %
Saccharose	Pflanze	0 - 2 %	max. 5 %
Maltose	Biene	2 - 8 %	-
Enzyme	Biene	Aktivität [U/ kg]	
Saccharase	Biene	20 - 200	
Glucoseoxidase	Biene + Blütenpollen	10 - 300	Diastasezahl (nach Schade)
Phosphatase	Biene	7 - 40	min. 8
Amylase	?	?	-
Inhibine			
Aminosäuren	Pflanze + Biene	200 - 2000 mg/ kg	-
Organische Säuren	Pflanze + Biene	300 - 600 mg/ kg	40 Milliäquivalent/ kg
Mineralstoffe	Pflanze	0,2 - 1 %	max. 0,6 %
Wasserstoffperoxid	enzymatische Bildung	bis zu 50 mg/ kg	-
HMF	Lagerung	-	max. 40 mg/ kg
	tropische Regionen	-	max. 80 mg/ kg

Der Wassergehalt der meisten Honige liegt zwischen 15 und 20 g/ 100 g Honig. Besonders wasserreich sind die Heidehonige, die einen Wassergehalt von bis zu 23 g/ 100 g Honig aufweisen können. Der Wassergehalt, sowie die Wasseraktivität (a_w -Wert) der Honige sind für die mikrobiologische Stabilität von Bedeutung. Die Zunahme des Wassergehaltes um 1 g /

100 g Honig resultiert in einer fünffachen Zunahme des Hefegehaltes, der schnell zu einer Gärung des Honigs führen kann. Der a_w -Wert der meisten Honige liegt zwischen 0,55 und 0,75, womit der Honig zu den mikrobiologisch stabilen Lebensmitteln gehört (Bogdanov, 1999).

Ein weiterer Parameter für die Qualitätsbeurteilung der Honige ist die Enzymaktivität. Sie wird als Marker für die Hitzebehandlung und Lagerung herangezogen. Die Veränderung bzw. die Abnahme der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Lagerung ist der Tabelle 2.4.1-2 zu entnehmen.

Tabelle 2.4.1-2: Halbwertszeit der Honigenzyme in Abhängigkeit von der Temperatur (White et al., 1964; White et al. 1978)

Temperatur [°C]	Halbwertszeit	
	Amylase (Diastase)	Saccharase
10	12600 d	9600 d
20	1480 d	820 d
30	200 d	83 d
40	31 d	9,6 d
50	5,4 d	1,3 d
60	1 d	4,7 h
70	5,3 h	47 min
80	1,2 h	8,6 min
durchschnittliche Aktivität	16- 24*	7,5- 10**

* g Stärke abgebaut/ 100 g Honig und h bei 40 °C

**g Saccharose hydrolysiert/ 100 g Honig und h bei 40 °C

Tabelle 2.4.1-3: Bildung von HMF in Honig in Abhängigkeit von der Lagertemperatur (White et al., 1964; White et al., 1978)

Temperatur [°C]	Zeit für die Bildung von 40 mg HMF/ kg
4	20- 80 Jahre
20	2- 4 Jahre
30	0,5- 1 Jahr
40	1- 2 Monate
50	5- 10 d
60	1- 2 d
70	6- 20 h

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) wird wie in 2.1.2.1 beschrieben aus Glucose und Fructose über 3-DG gebildet und ist mit einem Höchstwert von 40 mg/ kg Honig in der HonigV geregelt.

Frische und aus dem gemäßigten Klima stammende Honige weisen nur Spuren von 5-Hydroxymethylfurfural auf. Die Bildung des HMF in Abhängigkeit von der Lagerung und Temperatur ist in Tabelle 2.4.1-3 wiedergegeben. Für Honige aus den Regionen mit tropischem Klima ist der Höchstgehalt an HMF mit 80 mg/ kg angegeben.

2.4.2 Antibakterielle Wirkung von Honig

Die antibakterielle und heilende Wirkung von Honig wird seit schon über 9000 Jahren von Menschen genutzt. Schon Hypokrates (460-377 v. Chr.) erkannte die fiebersenkenden Eigenschaften des Honigs. Er empfahl den Honig zur Anwendung gegen eiternde Wunden. Den ersten wissenschaftlichen Nachweis über die antibakterielle Wirkung des Honigs lieferte *van Ketel (1892)*. *Sackett et al. (1919)* beobachteten eine Erhöhung der antibakteriellen Wirksamkeit bei verdünnten Honigen. Im Jahre 1937 wurde der Begriff "Inhibin", als Oberbegriff für alle antibakteriell wirksame Inhaltsstoffe im Honig eingeführt (*Dold et al., 1937*). Inhibine wurden als hitze- und lichtempfindliche Substanzen identifiziert, die nur für Natur- und nicht für Kunsthonige eigen sind. *Dold et al. (1937)* wiesen nach, dass der Blütenhonig unterschiedlich bakterienhemmend wirkt in Abhängigkeit vom Bakterienstamm. Das bis heute wichtigste Inhibin des Honigs, das Wasserstoffperoxid, wurde von *White et al. (1962, 1963)* als Produkt der im Honig natürlich vorkommenden Glucoseoxidase nachgewiesen. Die Glucoseoxidaseaktivität steigt mit dem zunehmenden Wassergehalt, so dass höhere Wasserstoffperoxidgehalte in frisch geernteten, jungen Honigen zu erwarten sind. Zum selben Zeitpunkt hat *Adcock (1962)* nachgewiesen, dass Wasserstoffperoxid durch die Einwirkung von Katalase zerstört wird. Honige, die reich an Wasserstoffperoxid sind, enthalten wenig Katalase und umgekehrt, was anhand von Messungen an 28 verschiedenen Honigproben belegt wurde (*White et al., 1964; Schepartz et al., 1966*). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Hitzeeinwirkung zwar die Glucoseoxidase inaktiviert und die H₂O₂-Produktion eingestellt wird, jedoch ein gewisses antibakterielles Potential der Honige erhalten bleibt. *White et al. (1964)* wiesen nach, dass ein ein Jahr lang gelagerter Honig, welcher kein H₂O₂ enthielt, trotzdem noch bakterienhemmend wirkte.

Die antibakterielle Aktivität des Honigs ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. Zum einen sind der hohe Zuckergehalt, ein niedriger pH-Wert und der H₂O₂-Gehalt der Honige für seine antimikrobielle Wirkung verantwortlich. Zum anderen zeigte sich, dass auch andere im

Honig vorkommende Substanzen bakterienhemmend wirken können. Diese Klasse der Inhibine wurde als "nicht-peroxid Inhibine" bezeichnet, die vierte Gruppe der im Honig vorkommenden Inhibine (*Allen et al., 1991*).

2.4.2.1 Osmotischer Effekt

Wie der Tabelle 2.4.1-1 zu entnehmen, ist Honig mit 65 % Gesamtzucker eine übersättigte Zuckerlösung, mit geringer Wasseraktivität, und ein mikrobiologisch stabiles Lebensmittel. Die meisten Mikroorganismen wachsen bei a_w -Werten von 0,94-0,99 (*Bogdanov, 1999*), was einer Honigverdünnung von 12 % entspricht. In frisch geernteten Honigen ist aufgrund des hohen Wassergehaltes ein Verderb durch osmophile Hefen möglich. Unterhalb eines Wassergehaltes von 17 % können jedoch keine Fermentationsprozesse mehr stattfinden, so dass man bei reifen Honigen keinen mikrobiologisch verursachten Verderb zu erwarten hat (*Molan, 2001*).

Um festzustellen, ob die antibakterielle Aktivität des Honigs nur aufgrund des hohen Zuckergehaltes zustande kommt, wurde der Honig dialysiert und dadurch der Zucker entfernt. Es konnte gezeigt werden, dass die dialysierte Honiglösung immer noch antibakteriell wirksam war (*Dustmann, 1972*). Da der Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* eine höhere Toleranz gegenüber den niedrigen a_w -Werten aufweist, und trotzdem empfindlich auf Honige reagiert, sind außer vom niedrigen a_w -Wert und hohem Zuckergehalt weitere Faktoren für die antibakterielle Eigenschaften der Honige verantwortlich (*Molan, 2001*).

2.4.2.2 Acidität

Der pH-Wert der meisten Honige liegt zwischen 3,3 und 4,6. Honigtauhonige haben einen etwas höheren pH-Wert, welcher zwischen 4,2 und 5,5 betragen kann (*Bogdanov, 1999*). Durch niedrigen pH-Wert sind die meisten pathogenen Mikroorganismen im Honig in ihrem Wachstum gehemmt. Es gibt jedoch einige Bakterienstämme, die gerade im Säuren ihr Wachstumsoptimum haben. So wachsen *E. coli* bei pH 4,3, *Salmonella sp.* bei 4,0, *Pseudomonas aeruginosa* bei 4,4 oder *Streptococcus pyogenes* bei 4,5 am optimalsten (*Molan, 2001, Molan, 1992a*).

2.4.2.3 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid gehört mit zu den wichtigsten Inhibinen des Honigs. Die ersten Beobachtungen zur zunehmenden antibakteriellen Aktivität der Honige im Zusammenhang mit der Verdünnung verzeichnete *Adcock (1962)*. Die Bildung des Wasserstoffperoxids erfolgt enzymatisch durch die im Honig schon vorhandene Glucoseoxidase. Dabei werden bei

der Oxidation von Wasser und Glucose Gluconsäure und Wasserstoffperoxid gebildet. Die Produktion des H_2O_2 während der Verdünnung des Honigs kann bis zu 1 mmol/l betragen. Obwohl die dabei gebildete Menge sehr gering ist, reicht sie offensichtlich aus, um das Bakterienwachstum zu hemmen (Molan, 2001). Da die Bildung des H_2O_2 enzymatisch erfolgt, wird sie durch Hitze- und Lichteinwirkungen stark beeinflusst (Bogdanov et al., 2001). Bei der Lagerung von Blüten- und Waldhonig über einen Zeitraum von 15 Monaten bei 25 °C wurden ein Abbau von H_2O_2 von ca. 50 % beim Blütenhonig bzw. von ca. 15 % beim Waldhonig gemessen. In einer weiteren Studie wurde der Einfluß einer 10-minütigen Lichteinwirkung auf 20 verschiedene Sortenhonige aus unterschiedlichen floralen Quellen untersucht. Die Abnahmen der Glucoseoxidaseaktivität und des Wasserstoffperoxidgehaltes betragen zwischen 1 und 95 %, was darauf hindeutet, dass auch die Inaktivierung der Glucoseoxidase im Honig sortenspezifisch ist. Gleichzeitig konnte eine stark verminderte antibakterielle Wirkung des Honigs gemessen werden (Dustmann, 1972).

Andererseits wird das Wasserstoffperoxid durch die Einwirkung der Katalase, die wie auch Glucoseoxidase im Honig natürlich vorkommt, abgebaut. Dies konnten erstmals Schepartz et al. (1966) nachweisen. Sie kamen zum Schluss, dass ein Zusammenhang zwischen der Glucoseoxidase- und Katalaseaktivität in Honigen besteht, so dass ein glucoseoxidasereicher Honig katalasearm sein muss.

Bei manchen Honigen wurde trotz der Zerstörung des H_2O_2 -produzierenden Enzyms eine nur geringfügig bis gar nicht verminderte antibakterielle Aktivität gemessen. Hier sind ganz besonders Manuka-Honige Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Es zeigte sich in mehreren unabhängigen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen, dass besonders Manuka-Honige stark antimikrobiell wirken, dabei wasserstoffperoxidarm sind und auch nach einer Katalasebehandlung unveränderte antibakterielle Aktivität aufweisen (Allen et al., 1991; Weston et al., 1999; Snow et al., 2004).

2.4.2.4 Nicht-peroxid Faktoren

Entfernt man die üblichen drei Inhibine des Honigs, indem man beispielsweise Zucker durch Dialyse entfernt (White et al., 1963), den Honig in basische, neutrale und saure Fraktionen mittels verschiedener Extraktionsmittel trennt (Bogdanov et al., 1997, 2001), oder das Wasserstoffperoxid durch Hitze- oder Katalasebehandlung entfernt (Allen et al., 1991), bleibt bei vielen Honigen eine nicht vernachlässigbare antibakterielle Aktivität erhalten. Diese Inhibine werden als "nicht-peroxid Inhibine" bezeichnet und gehören zu den Faktoren, die pflanzenabhängig sind. Dass die inhibierende Wirkung der Honige auf pflanzliche und natürliche Herkunft zurückzuführen ist, zeigten Dold et al. (1937), indem sie Naturhonig und

einen selbst hergestellten Kunsthonig gegen verschiedene Bakterienstämme mittels Lochagar-diffusionstest getestet haben. Der Kunsthonig war in allen Tests als nicht wirksam eingestuft worden. *Bogdanov et al. (1997)* zeigten anhand von 20 verschiedenen Honigproben unterschiedliche auf "nicht-peroxid Inhibine" zurückzuführende hemmende Aktivität gegenüber von *S. aureus*. Die Inhibierungsspanne lag zwischen 37 %-iger wässriger Verdünnung bei Rhododendronhonig und 74 %-iger wässriger Verdünnung bei Rapshonig. Weitere Unterschiede in der Zusammensetzung der Inhibine konnten belegt werden, indem Honige in basische, saure und neutrale Fraktionen getrennt wurden. Der Rapshonig enthielt die meiste antibakterielle Aktivität in der neutralen Fraktion, wogegen der Manuka-Honig am wirksamsten in der Säurefraktion war. Jedoch hängt die antibakterielle Aktivität mit den in der Säurefraktion enthaltenen Inhibinen und nicht mit dem pH-Wert zusammen (*Bogdanov, 1997*). Bei dem schweizerischen Bergblütenhonig sind es die basischen Inhibine, die zur Wirksamkeit des Honigs beitragen.

Dass eine Zuckerlösung antibakteriell wirkt, zeigten *Suortti et al. (1984)*, indem sie 5 %-ige wässrige Glucose- und Fructoselösungen erhitzt haben und gegen *E. coli* im Lochagar-diffusionstest getestet haben. Nach 1 h Erhitzungszeit bei 110 °C konnte kein Wachstum der *E. coli* aufgezeichnet werden. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass nicht nur der Zuckergehalt und somit auch der a_w -Wert für die antibakterielle Eigenschaften des Honigs verantwortlich sind, sondern auch dass die aus dem Zuckerabbau stammende Verbindungen antibakteriell wirken (vgl. 2.1.3).

Wie schon in 2.4.2.3 angedeutet, nimmt der Manuka-Honig als Vertreter der wasserstoffperoxidarmen, aber antibakteriell wirksamen Honigen einen besonderen Stellenwert an. Das für die antibakterielle Wirkung der Manuka-Honige verantwortliche Inhibin ist bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Aus 345 untersuchten verschiedenen Honigsorten wurde Manuka-Honig als Honig mit höchstem und unverändertem antibakteriellen Potential auf nicht-peroxid Basis eingestuft (*Allen et al., 1991*). Als wirksame Verbindungen in Manuka-Honigen wurden nach Extraktion mit Ethanol/ Ether zwei aromatische Säuren identifiziert, nämlich die 4-Hydroxy-3,5-dimethoxybenzoesäure (Syringasäure) und das 4-Hydroxy-3,5-dimethoxymethylbenzoat (Methylsyringasäure) (Abb. 2.4.2.4-1, **59** und **60**) (*Russell et al., 1990*).

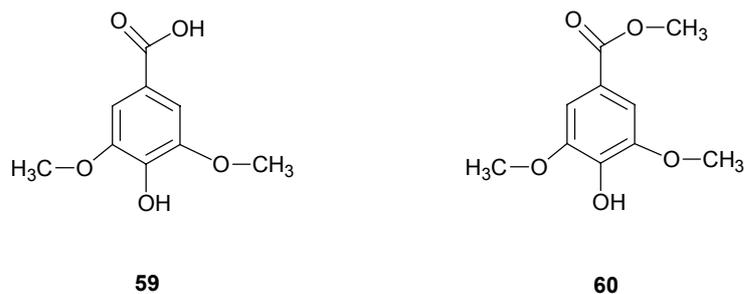


Abbildung 2.4.2.4-1: Aus Manuka Honig isolierte antibakteriell wirksame aromatische Säuren: **59** 4-Hydroxy-3,5-Dimethoxybenzoesäure (Syringasäure); **60** 4-Hydroxy-3,5-Dimethoxymethylbenzoat (Methylsyringasäure)

Diese Ergebnisse bestätigten *Weston et al. (1999)*. Sie fanden, dass Methylsyringasäure als Hauptverbindung zu 45 % im totalen phenolischen Extrakt eines Manuka-Honigs vorhanden war, aber sowohl im aktiven als auch im nicht-aktiven Manuka-Honig vorkommt. Man kann somit die Methylsyringasäure als manukaspezifisches "nicht-peroxid Inhibin" ausschließen. Die meiste antibakterielle Aktivität zeigte überraschenderweise nicht die Fraktion mit hauptsächlich phenolischen Verbindungen, sondern die kohlenhydratreiche Fraktion. Da *Suortti et al. (1984)* nachgewiesen haben, dass erhitzte Glucose und Fructose Lösungen im Lochagardiffusionstest gegenüber *E. coli* hemmend wirken, kann man die Vermutung aufstellen, dass Zuckerabbauprodukte für die antibakterielle Aktivität von Honig von Bedeutung sind.

2.4.3 Manuka-Honig

Manuka (*Leptospermum scoparium*) ist der neuseeländliche immergrüne Teebaum, der bis zu 15 m hoch werden kann. Die Blätter haben einen aromatischen Geruch und herben Geschmack. Die Blütenfarbe variiert von weiß bis rosa (Abb. 2.4.3-1). Die Verwendung der Manuka-Pflanze fand schon bei den Ureinwohnern Neuseelands statt, die die Pflanze zur Behandlung von Verletzungen, Entzündungen und Verbrennungen einsetzten (www.neuseelandhaus.de).

Obwohl die antibakteriellen Eigenschaften der Honige schon seit hundert Jahren untersucht werden, fand eine intensive Forschung an Manuka-Honigen erst in neuerer Zeit statt. Wie schon in 2.4.2.4 beschrieben, zeigen Manuka-Honige aufgrund ihrer hitzestabilen nicht-peroxid Inhibine im Vergleich zu anderen Honigen höhere antibakterielle Aktivität.



Abbildung 2.4.3-1: Manuka Pflanze: (links) *Leptospermum scoparium alba*; (rechts) *Leptospermum scoparium* (www.flora-toskana.de)

Sie werden für kommerzielle Zwecke mit einem für Manuka-Honige definierten "UMF-Wert" (Unique Manuka Factor) eingestuft, der die antibakterielle Aktivität des Honigs ausdrückt (www.neuseelandhaus.de, www.airborne.co.nz/manuka.htm). Ein Manuka-Honig UMF 10 weist eine antibakterielle Aktivität auf, die vergleichbar ist mit einer 10 %-igen phenolischen Lösung. Die antimikrobielle Aktivität der Manuka-Honige wurde in verschiedenen Studien und gegen verschiedene Bakterienstämme getestet. Die Intensität der Hemmung wurde mit dem MIC-Wert (Minimal Inhibitory Concentration) ausgedrückt. Unter MIC versteht man die minimale Konzentration des Honigs, die notwendig ist, um das Bakterienwachstum zu hemmen. *Willix et al. (1992)* untersuchten die Wirkung von mit Katalase behandeltem Manuka-Honig im Vergleich zu einem Mischhonig gegen verschiedene Bakterienstämme. Die Autoren konnten feststellen, dass sich der Manuka Honig mit MIC-Werten von 3,7 % (v/v) für *E. coli* und 1,8 % für *S. aureus* als besonders wirksam erwies. *Molan et al. (1996)* wiesen nach, dass Manuka Honig auch nach Gammabestrahlung zur Sterilisation seine antibakterielle Eigenschaften behielt. Aufgrund dieser Tatsachen findet der Honig immer mehr Anwendung in der Medizin. Da von allen getesteten Bakterienstämmen *S. aureus* am empfindlichsten auf Inhibine reagiert, und eine Resistenz gegenüber viele Antibiotika entwickelt hat, bieten sich der Honig und auf Honigbasis entwickelte Präparate zur Behandlung von *S. aureus* induzierten Infektionen an

Tonks et al. (2003) untersuchten die Rolle des Honigs in der Wundheilung, indem sie humane monocytären Leukämiezelllinien MonoMac-6 (MM6) nach der Exposition mit Honig auf die Produktion von Cytokinen untersucht haben. *Tonks et al. (2003)* zeigten, dass neuseeländischer Manuka- und australischer Jelly-Bush-Honig die Bildung der Cytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6, die im Heilungs- und Entzündungsprozess von Bedeutung sind, stimulieren. Diese Effekte konnten bei einem Kunsthonig nicht beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass diese Eigenschaft pflanzenspezifisch ist. Der genaue Mechanismus ist noch ungeklärt.

Manuka-Honig findet Anwendung bei der Behandlung von Mastitis bei Kühen und Ziegen, wodurch der Einsatz von Antibiotika erspart bleibt. 1- 5 %-ige Honig Lösungen reichen schon aus, um eine inhibierende Wirkung zu gewährleisten (<http://bio.waikato.ac.nz/honey>). Ein weiteres Anwendungsgebiet von Honigen stellt die Behandlung von Magen- und Zwölffingerdarmgeschwüren, sowie von Verdauungsstörungen dar. So zeigt der Manuka-Honig gegen *Helicobacter pylori* einen MIC Wert von 5 %, wogegen andere Honige in einer Verdünnung > 40 % vorhanden sein müssen, um dieselbe Wirkung zu erzielen (*Molan, 2001*).

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Ameisensäure, 98- 100 %	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)	33015
Aminopeptidase M (aus Schweinenieren), 20 U/ ml	Roche (Mannheim, Deutschland)	0102768
Ammoniak, 25 %, p.a.	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)	30501
Anilin, z. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)	101261
Arabinose	Merck (Darmstadt, Deutschland)	101492
Benzaldehyd, 99,5 %	Fluka (Buchs, Schweiz)	418099
Benzoylhydrazin, 98 %	Acros (Geel, Belgien)	105771000
2-Butanon, 99 %	Acros (Geel, Deutschland)	149670010
N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin	Bachem, (Heidelberg, Deutschland)	A1205.0025
Chloroform, z. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)	102445
Citronensäure Monohydrat, p.a.	Fluka (Taufkirchen, Deutschland)	27490
3-Desoxyglucoson	TU Dresden, Syntheseprodukt	
Deuteriumoxid, D ₂ O, 100,00 Atom % D	Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	19, 170-1
Diethylether, reinst	Merck (Darmstadt, Deutschland)	100926
Dimethylsulfoxid-d ₆ , 99,5+ Atom % D	Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	17, 594-3
Diphenylamin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	D2385
Essigsäure, p.a.	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)	33209
Ethanol 96 % p. a.	Fluka (Taufkirchen, Deutschland)	02893
Ethylacetat, z. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)	109623
α-D-Galactopyranosid	Fluka (München, Deutschland)	S78, 311-0
D-(+)-Glucose	Fluka (München, Deutschland)	49139
Glyoxal, 40 % in Wasser	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	G-3140
n-Hexan, für GC, > 99 %	Fluka (München, Deutschland)	52767
5-Hydroxymethylfurfural	Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	W501808
Kaliumhydroxid, > 96 %, p.a.	Fluka (München, Deutschland)	60370
Kationentauscher AG® 50 W-X8, H ⁺ Form, 20-50 mesh	BioRad Laboratories (München, Deutschland)	142-1421
Kationentauscher DOWEX, 50 W, X8-400, H ⁺ Form, 200-400 mesh	Acros (Geel, Belgien)	20308
Lactose Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)	107660
Lactulose, HPLC, purum, > 98 %	Fluka (München, Deutschland)	61360
Maltose Monohydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)	105912

3 Material und Methoden

Chemikalie	Firma	Bestellnummer
Merckoquant Peroxidstäbchentest, 0- 25	Merck (Darmstadt, Deutschland)	110011
Merckoquant Peroxidstäbchentest, 0- 100	Merck (Darmstadt, Deutschland)	110084
Methanol, HPLC Grade	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)	65548
Methylglyoxal, 40 % in Wasser	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	M-0252
N- α -Hippuryl-L-arginin	Bachem (Heidelberg, Deutschland)	G-2265
Natriumcarbonat, wasserfrei	Merck (Darmstadt, Deutschland)	106395
Ninhydrin, p. A.	Riedel-de Haen (Seelze, Deutschland)	33437
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)	106446
Natriumhydroxid, z. A.	Merck (Darmstadt, Deutschland)	106498
H-Ornithin-OH * HCl	Bachem (Heidelberg, Deutschland)	F1965.0250
Pepsin (aus Schweinemagenschleimhaut), 20 FIP-U	Merck Eurolab (Darmstadt, Deutschland)	107192
o-Phenylendiamin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	P9029
Phosphorsäure, 85 % in Wasser	Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)	452289
Prolidase (aus Schweineniere), 100 U/ mg Protein	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	P6675
Pronase E (aus <i>Streptomyces griseus</i>), 4000000 PU/ g	Merck Eurolab (Darmstat, Deutschland)	107433
Pyridin, purum, > 99 %	Fluka (Taufkirchen, Deutschland)	82703
D-(+)-Raffinose Pentahydrat, > 98 %	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	R0250
Salzsäure, 37 %, ACS (für Salzsäurehydrolysen)	J. T. Baker (Deventer, Holland)	6011
Serdolit MB1	Serva (Heidelberg, Deutschland)	40701.03
p-Toluidin	Sigma (Taufkirchen, Deutschland)	T-8766
1-(Trimethylsilyl)-imidazol	Fluka (München, Deutschland)	394874
Chlortrimethylsilan, > 99 %, für GC	Fluka (München, Deutschland)	92360
2,3,3-Trichlorotetrahydro- 2H-pyran, 97 %	Acros (Geel, Belgien)	278640100
Tris-hydroxymethyl- aminomethan (TRIS), > 99 %	Fluka (Taufkirchen, Deutschland)	93349
L-Valin	Merck Eurolab (Darmstat, Deutschland)	108495

3.1.2 Geräte und Hilfsmaterial

Gerät	Beschreibung	Firma
Äkta Basic System	Pumpe P-900, UV-Detektor UV-900, Autosampler A-900	Pharmacia (Freiburg, Deutschland)
Analysenwaage	BP 121S BP 3100S	Satorius (Göttingen, Deutschland)
Aminosäureanalysator	Alpha Plus	LKB Biochrom (Cambridge, UK)
DC-Platten	Kleindimensioniert, Kieselgel 60 F ₂₅₄	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
HPLC Anlage	Degasser, Pumpe K 1001, Mixer, UV Detektor K 2051	Knauer (Berlin, Deutschland)
RP-HPLC Säule	100 × 4.5 mm, Eurospher 100 RP-18, 5µm	Knauer (Berlin, Deutschland)
RP-HPLC Säule	250×16 mm, Eurospher 100 RP-18, 15 µm	Knauer (Berlin, Deutschland)
Evaporator Gefriertrocknungsanlagen	TurboVapLV, Zymark ALPHA Christ 1-2 BETA Christ 1-8K	(Osterode, Deutschland)
Kartusche für SPE Kolbenhubpipetten	Strata C18-E Eppendorf Reference (unterschiedliche Volumina)	Phenomenex (Deutschland) Eppendorf-Nethler-Hinz (Hamburg, Deutschland)
LC-MS	Liquidchromatography system 1100 ESI-TOF Massenspektrometer	Agilent Technologies (PaloAlto, USA) Perseptive Biosystem (Framingham, USA)
Membranfilter	Regenerierte Cellulose RC50, Porengröße 50 mm, Porenweite 0,45 µm	Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland)
NMR NMR- Röhren	Bruker DRX 500 Schott Proffesional, id. 4,20 mm	Reinstetten (Deutschland) Schottglas Mainz (Deutschland)
Peaksäule	Ionenaustauscher Serie 686	Laborbedarf K. Grüning (Olching, Deutschland)
pH-Meßgerät Reagenzglasschüttler	InoLab level 2 MS1 Minishaker	WTW (Weinheim , Deutschland) IKA Labortechnik (Staufen, Deutschland)
Reinstwasseranlage Rotationsverdampfer	USF Elga Purelab Plus Laborota 4000	Seralplus (Ransbach, Deutschland) (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Rühr- und Heizwerk	IKAMAG	Janke & Klenkel GmbH (Staufen, Deutschland)
Schraubenreagenzgläser	Duran 12 mm×100 mm GL Duran 16 mm×160 mm GL	Schott Glaswerke (Mainz, Deutschland)

3 Material und Methoden

Gerät	Beschreibung	Firma
Schraubendeckelgläser	Unterschiedliche Volumina von 25 ml bis 2000 ml	Schottglaswerke (Mainz, Deutschland)
Trockenschrank	Modell 200, Memmert	(Schwabach, Deutschland)
Ultraschallbad	Sonorex RK 510 Super	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Vakuumkonzentrator	Speed Vac Plus SC 110 AR mit Universal Vacuum System Plus UVS400A	Savant (Farmingdale, USA)

3.2 Handelsproben und Erhitzungsansätze

3.2.1 Handelsproben

Käuflich erworbene Handelsmilchprodukte von verschiedenen Herstellern wurden untersucht. Bei Milchpulver erfolgt die Zubereitung laut Angabe auf der Verpackung bzw. direkte Inkubation im trockenen Zustand. Milchproben, unbehandelt und hitzebehandelt der Aminosäureanalyse nach entsprechender enzymatischer bzw. Säurehydrolyse unterziehen. Bei den Milchproben handelt es sich um Rohmilchproben, pasteurisierte Milch, UHT-Milch, wärmebehandelte und sterilisierte Kondensmilch, Kaffeesahne (wärmebehandelt und sterilisiert), aromatisierte und sterilisierte Milchdrinks, Voll- und Magermilchpulver, Molkenpulver.

3.2.2 Erhitzungsansätze

3.2.2.1 Modellansätze mit Standardsubstanzen

0,5 M Phosphatpuffer: 2,86 g Phosphorsäure in ca. 30 ml dest. Wasser lösen, mit verdünnter KOH den pH-Wert einstellen (6,0- 9,0) und mit dest. Wasser auf 50 ml auffüllen.

Zur Herstellung einer 1 mmolaren N- α -Hippuryl-arginin (Hip-Arg) Lösung 35 mg Hip-Arg in einen 100 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen.

Zur Herstellung einer 10 mmolaren Lactoselösung 36 mg Lactose-Monohydrat bzw. Maltose-Monohydrat in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen.

Zur Herstellung einer 10 mmolaren Lactuloselösung 34 mg Lactulose in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen.

Zur Herstellung einer 10 mmolaren Raffinoselösung 60 mg Raffinose-Pentahydrat in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen.

Zur Herstellung einer 10 mmolaren Glucoselösung 18 mg Glucose in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen.

Jeweils 500 µl der 1 mmolaren Hip-Arg-Lösung mit 500 µl der 10 mmolaren Lactose, Lactulose, Maltose, Glucose oder Raffinose (molares Verhältnis 1:10) in einem Schottröhrchen mit Schraubverschluss mischen, verschließen und bis zu 8 h bei 100 °C in einem vortemperierten Sandbad im Trockenschrank erhitzen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur einzelne Inkubationsansätze membranfiltrieren (RC 50, 0,45 µm) und mittels RP-HPLC bezüglich des Abbaus von Hip-Arg und der Bildung von Hippurylderivaten untersuchen (siehe 3.3.2.2).

3.2.2.2 Caseinisolat aus Milchproben

Die Isolierung von Casein aus Milch wurde nach *Siegl (2003)* vorgenommen. Dazu 100 ml einer Rohmilch 1:1 mit dest. Wasser verdünnen, zentrifugieren (10 min, 3000 U/min) und mit verdünnter Salzsäure (1 N) auf pH 4,6 einstellen. Das so gefällte Rohcasein von der Molke durch erneute Zentrifugation (10 min, 3000 U/min) abtrennen und in wenig Wasser suspendieren. Das Casein durch Zugabe von 1 N NaOH wieder lösen (pH 7,0) und wie oben beschrieben mit Salzsäure nochmals fällen. Das so gewonnene Casein jeweils zweimal mit Ethanol und Aceton waschen, in wenig Wasser aufnehmen und gefriertrocknen. Das fein gemahlene Casein trocken bei – 18 °C aufbewahren.

3.2.2.3 Casein/ Lactose Erhitzungsansätze

240 mg Casein (siehe 3.2.2.2) in 50 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 lösen. In 10 ml dieser Lösung jeweils 97 mg bzw. 291 mg Lactose suspendieren, um ein molares Verhältnis Lysin:Lactose von 1:10 bzw. von 1:30 zu erzielen. Jeweils 10 ml der so hergestellten Modellansätze in ein Reagenzglas mit Schraubverschluss geben, verschließen und bis zu 5 h bei 100 °C in einem vortemperierten Sandbad im Trockenschrank inkubieren. Zum Entfernen des überschüssigen Zuckers die Reaktionsgemische dialysieren. Dazu werden Membranen mit einem cut-off von 12 bis 16 kD und einer Porengröße von 25 Å verwendet (Biomol, Hamburg). Die Membranen für eine Stunde in 10 % (v/v) Essigsäure legen und mit dest. Wasser säurefrei waschen. Je 2 ml der Probelösungen in die Dialysemembranen füllen, mit Dialyseklammern verschließen und für 24 h gegen fließendes Wasser dialysieren. Danach dreimal 8 Stunden gegen dest. Wasser bei einer Temperatur von 4 bis 6 °C dialysieren. Dialysate anschließend gefriertrocknen. Je 10 mg des so gewonnenen Pulvers einwiegen und der enzymatischen bzw. Säurehydrolyse unterziehen (vgl. 3.3.1). Zur Untersuchung

hinsichtlich des Abbaus von Arginin Proben membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und mittels ASA untersuchen (siehe 3.3.4).

3.2.2.4 Lactose Erhitzungsansätze

180 mg Lactose-Monohydrat (50 mmol/ l) in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 bis zur Markierung auffüllen. Jeweils 1 ml dieser Lösung in ein Schottröhrchen mit Schraubverschluss geben, verschließen und bei 100 °C in einem vortemperierten Sandbad im Trockenschrank bis zu 8 h inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur Probelösungen mit 0,3 ml Phosphatpuffer (0,5 M, pH 7,0) und 0,3 ml einer 0,2 %-igen wässrigen o-Phenylendiamin (OPD) Lösung versetzen und im Dunkeln, bei Raumtemperatur für ca. 12 h derivatisieren. Nach der Membranfiltration Probelösungen auf Chinoxaline mittels RP-HPLC mit der UV Detektion bei 312 nm untersuchen (siehe 3.3.2.3).

3.2.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Bildung von 2-(2-Benzoylaminoacetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

3.2.3.1 Einfluß des pH-Wertes

Je 1 ml der unter 3.2.2.1 beschriebenen Probenansätze in 0,5 M Phosphatpuffer mit pH-Werten von 6,0 bis 9,0 (vgl. 3.2.2.1) in Schottröhrchen mit Schraubverschluss bis zu 2 h bei 100 °C in einem vortemperierten Sandbad im Trockenschrank inkubieren. Proben nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und mittels RP-HPLC bezüglich des Abbaus von Hip-Arg und der Bildung von Hip-PIO untersuchen.

3.2.3.2 Einfluß der Inkubationszeit und Temperatur

Je 1 ml der unter 3.2.2.1 beschriebenen Probenansätze im vortemperierten Sandbad bei 100 °C bis zu 6 h inkubieren. Die Probenentnahme erfolgt in 30-minütigen Abständen.

Je 1 ml der unter 3.2.2.1 beschriebenen Probenansätze in Schottröhrchen mit Schraubverschluss einfüllen und bei 100 °C, 120 °C und 150 °C im vortemperierten Sandbad im Trockenschrank inkubieren. Proben nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und mittels RP-HPLC hinsichtlich des Abbaus von Hip-Arg und der Bildung von Hip-PIO untersuchen.

3.2.3.3 Einfluß des molaren Verhältnisses Hip-Arg:Lactose

Für die Ermittlung des optimalen molaren Verhältnisses Lactose zu Hip-Arg eine 1 mmolare Hip-Arg-Lösung wie in 3.2.2.1 beschrieben herstellen. Zur Herstellung einer 100 mmolaren

Lactose Lösung 361 mg Lactose Monohydrat in 10 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 lösen und wie in Tabelle 3.2.3.3-1 dargestellt mit 1 mmolarer Hip-Arg-Lösung mischen.

Tabelle 3.2.3.3-1: Pipettierschema zur Ermittlung des optimalen molaren Verhältnisses Hip-Arg zu Lactose

Molares Verhältnis Hip-Arg: Lactose	1 mmol Hip-Arg [μ l]	100 mmol Lac [μ l]	dest. Wasser [μ l]
1:5	1000	50	950
1:10	1000	100	900
1:20	1000	200	800
1:30	1000	300	700
1:50	1000	500	500
1:100	1000	1000	0

Jeweils 1 ml der nach Tabelle 3.2.3.3-1 hergestellten Lösungen in ein Schottröhrchen mit Schraubverschluss geben und bei 100 °C im vortemperierten Sandbad im Trockenschrank für 2 h und 4 h inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur und Membranfiltrieren (RC50, 0,45 μ m) die Bildungsrate von Hip-PIO mittels RP-HPLC untersuchen (siehe 3.3.2.2).

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Hydrolysesysteme

3.3.1.1 Säurehydrolyse

Die totale Säurehydrolyse der Proteine wird nach dem Verfahren von *Henle et al. (1991)* vorgenommen. Das Untersuchungsmaterial in Abhängigkeit vom Proteingehalt (vergleiche Tabelle 3.3.1.1-1) in Pyrexgläser (160 mm \times 16 mm) genau einwiegen, auf 5 ml mit dest. Wasser verdünnen und mit 5 ml konzentrierter HCl versetzen (entspricht einer 6 N HCl im Gesamtvolumen). Die Säurehydrolyse im Trockenschrank bei 110 °C in einem vorgeheizten Sandbad für 23 h durchführen. Nach der ersten Stunde der Inkubation sind die Proben gut zu schütteln. Nach der abgeschlossenen Hydrolyse die heißen Pyrexgläser im Eisbad abkühlen. Das entsprechende Aliquot der Probelösung in der Vakuumzentrifuge zur Trockene einengen, in 0,2 M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufnehmen und für weitere Untersuchungen verwenden.

Tabelle 3.3.1.1-1: Probeneinwaage für die Bestimmung der Aminosäuren

Probe	Einwaage [mg]	Aliquot [μ l]
Casein	10	1000
Milchpulver	10	500
Molkenpulver	25- 30	500
Milch	500 μ l	1000

3.3.1.2 Enzymatische Hydrolyse

Die enzymatische Hydrolyse wird nach dem Verfahren von *Henle et al. (1991)* vorgenommen. Dazu folgende Enzyme bzw. Enzymlösungen herstellen:

Schritt 1: Pepsinlösung 2 mg (20 FIP-U) Pepsin in 1000 μ l 0,02 N Salzsäure lösen

Schritt 2: Pronaselösung 2 mg (8000 PU) Pronase E in 1000 μ l Tris/ HCl-Puffer pH 8,2 lösen

Schritt 3: Aminopeptidase M gebrauchsfertige Suspension (20 U/ ml)
Prolidase 13,3 mg (31 U/ mg) in 1000 μ l Reinstwasser suspendieren

2 M Tris Puffer: 24,22 g Tris in bidest. Wasser lösen. Den pH-Wert mit HCl auf 8,2 einstellen und auf 100 ml auffüllen

Das Untersuchungsmaterial so einwiegen, dass der Proteingehalt im Ansatz zwischen 2 und 3 mg beträgt. Die Probe dann in 1 ml 0,02 N HCl lösen, mit 50 μ l Pepsinlösung versetzen, gut schütteln und für 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubieren. Im zweiten Schritt 250 μ l Trispuffer und 50 μ l Pronase E zugeben, erneut gut durchmischen und 24 h bei 37 °C inkubieren. Im letzten Schritt der enzymatischen Verdauung 20 μ l Aminopeptidase M und 40 μ l Prolidase zusetzen und für weitere 24 h bei 37 °C inkubieren.

Nach der Inkubation Proben einfrieren und gefriertrocknen. Den Rückstand in 1 ml 0,2 M Natriumcitratpuffer pH 2,2 aufnehmen, membranfiltrieren (RC50, 0,45 μ m) und für weitere Untersuchungen einsetzen.

3.3.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

3.3.2.1 Gerätesystem und Probenvorbereitungen

Analytische RP-HPLC wurde am System Äkta Basic 10XT bestehend aus Autosampler A-900, binärer Hochdruckpumpe P-900 und UV Detektor UV-900 durchgeführt (alles

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Außerdem wurden der Säulenofen (Knauer, Berlin) und 4-Kanal Degasser K-5004 (Knauer, Berlin) verwendet.

Die semi-präparative RP-HPLC erfolgte am System vom Knauer (Berlin, Deutschland), bestehend aus: Pumpe K1001, 4-Kanal Degasser K-5004, Lösungsmittelmischkammer K1500 und UV Detektor K2501.

Probenvorbereitung für die Bestimmung von Hippuryderivaten

Für die Bestimmung von Hippuryderivaten mittels RP-HPLC Modellansätze Hip-Arg und Lactose (1:5 bis 1:100, molares Verhältnis), wie in 3.2.2 beschrieben in einem vortemperierten Sandbad bei 100 °C im Trockenschrank für mehrere Stunden inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur die zu untersuchenden Proben membranfiltrieren (RC 50, 0,4 µm) und zur RP-HPLC geben.

Probenvorbereitung für die Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen

Um 1,2-Dicarbonylverbindungen mittels RP-HPLC und UV-Detektion bestimmen zu können, müssen sie in UV-aktive Chinoxaline überführt werden. Dazu 1 ml der Probelösung (vgl. 3.2.2.4) mit 0,3 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 und 0,3 ml einer 0,2 %-igen wässrigen o-Phenylendiamin (OPD) Lösung versetzen und 12 h lang im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Proben membranfiltrieren und zur RP-HPLC geben (*Weigel et al., 2004*).

3.3.2.2 Untersuchungen zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

Analytische RP-HPLC

Säule:	Eurospher 100 RP-18, 5 µm, 100 × 4,6 mm, mit integrierter 10 mm- Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,8 ml/ min
Wellenlänge:	220 und 254 nm
Elution:	Fließmittel A: 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) in Wasser Fließmittel B: Methanol (HPLC-Qualität)

Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0- 2	95	5
2- 17	75	25
17- 22	50	50
22- 27	0	100
27- 42	95	5

Semi-präparative RP-HPLC

Säule: Eurospher 100 RP-18, 15 µm, 250 × 16 mm, Knauer, Berlin

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 1- 2 ml

Flussrate: 8 ml/ min

Wellenlänge: 220 nm

Elution: Trennung A:

Fließmittel A: 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0

Fließmittel B: Methanol (HPLC-Qualität)

Trennung B (Entsalzen):

Fließmittel A: 0,01 M Essigsäure in Wasser

Fließmittel B: 0,01 M Essigsäure in Methanol

Gradient: siehe oben

3.3.2.3 Untersuchungen zur Bildung von Chinoxalinen

Analytische RP-HPLC

Säule: Eurospher 100 RP-18, 5 µm, 100 × 4,6 mm, mit integrierter 10 mm- Vorsäule, Knauer, Berlin

Säulentemperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 20 µl

Flussrate: 1 ml/ min

Wellenlänge: 312, 220 und 280 nm parallel

Elution: Fließmittel A: 0,075 % Essigsäure in Wasser

Fließmittel B: zu 20 % Fließmittel A und zu 80 % Methanol (HPLC-Qualität)

Gradient:

Zeit [min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	40	60
20	0	100
23	40	60
30	40	60

Semi-präparative RP-HPLC

Säule:	Eurospher 100 RP-18, 15 µm, 250 × 16 mm, Knauer, Berlin
Säulentemperatur:	30 °C
Injektionsvolumen:	1- 2 ml
Flussrate:	10 ml/ min
Wellenlänge:	312 nm
Elution:	siehe oben
Gradient:	siehe oben

3.3.2.4 Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)

Analytische RP-HPLC

Säule:	Eurospher 100 RP-18, 5 µm, 250 × 4,6 mm, mit integrierter 10 mm- Vorsäule, Knauer, Berlin
Säulentemperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	1 ml/ min
Wellenlänge:	283 nm
Elution:	isokratisch
	Fließmittel A: 15 % Methanol, HPLC-Qualität
	Fließmittel B: 85 % 0,05M Phosphatpuffer, pH 5,5

3.3.3 Ionenaustauschchromatographie

3.3.3.1 Gerätesystem

System:	Bio-Rad Anlage bestehend aus Econo Pumpe, Econo System Controller, Econo UV Monitor EM-1 und Fraktionssammler 2110 (München, Deutschland)
Säule:	Glassäule 30 × 3,5 cm

Säulenmaterial für
die semi-präparative

Trennung: DOWEX H⁺ 50W, X8- 400, 200- 400 mesh, ca. 80 g

Säulenmaterial für die

Entsalzung: AG® 50 W-X8, 20- 50 mesh, ca. 30 g

Flussrate: 0,5- 1 ml/ min

3.3.3.2 Chromatographische Trennung von Argininderivaten

Präparative Trennung von PIO und Hydrolyseprodukten

Für die Vorbereitung der Säule für die präparative Ionenaustauschchromatographie ca. 80 g Kationenaustauscher DOWEX H⁺ in wenig dest. Wasser aufnehmen, über Nacht bei Raumtemperatur quellen lassen und in die Säule einfüllen. Den Austauscherharz mit 200 ml Reinstwasser waschen und mit 200 ml Citratpuffer B äquilibrieren. 20 ml Probe mit Hilfe der Pumpe mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min auf die Säule bringen. Den Ionenaustauscher mit 400 ml Citratpuffer B waschen. Die Fraktionierung mit 2000 ml Citratpuffer C mit Hilfe von einem Fraktionssammler vornehmen. Insgesamt 200 Fraktionen zu je 10 ml sammeln und diese einzeln auf die Anwesenheit von Arginin und seinen Derivaten mittels Tüpfeltest mit Ninhydrinfärbung und Dünnschichtchromatographie prüfen. Die Regenerierung des Ionenaustauschers erfolgt mit 500 ml 6 N HCl mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/ min und anschließendem Waschen der Säule mit 500 ml Reinstwasser.

Citratpuffer B: 0,1 M; pH 3,15
4,00 g NaOH und 21,01 g Citronensäure Monohydrat in 900 ml bidest. Wasser lösen, mit konz. Salzsäure auf pH 3,15 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

Citratpuffer C: 0,3 M, pH 5,15
3,04 g Citronensäure Monohydrat und 12,00 g NaOH in 900 ml bidest. Wasser lösen, mit konz. Natronlauge auf pH 5,15 einstellen und auf 1000 ml auffüllen

Entsalzung von PIO und Hydrolyseprodukten

PIO-haltige Fraktionen werden am stark sauren Kationenaustauscher AG® (50 g) entsalzt. Dazu den Austauscher mit 200 ml 6 N HCl und einer Flussrate von 1 ml/ min in die H⁺-Form

bringen. Den pH-Wert durch Spülen mit Reinstwasser auf 4-5 einstellen und 50 ml Probe mit einer Flussrate von 0,5 ml/ min aufgeben. Den Austauscher mit 200 ml Reinstwasser waschen, mit 200 ml 2 N HCl den Citrat und mit 200 ml 4 N HCl die Probe als Hydrochlorid eluieren.

3.3.3.3 Tüpfeltest

Kieselgelplatte: Fertigplatte 10 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm
Auftragsmenge: 2 µl/ Fraktion
Sprühreagenz: 0,2 %-ige ethanolische Ninhydrinlösung
Entwicklung: Trockenschrank, 100 °C

3.3.3.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die im Tüpfeltest ninhydrinpositive Fraktionen mittels DC einzeln auf PIO und PIO Abbauprodukte untersuchen.

DC-Platte: Kieselgel 60, UV₂₅₄, Schichtdicke 0,25 mm
Kammer: kleindimensioniert, ungesättigt
Auftragsmenge: 5 µl/ Fraktion
Fließmittel: Dichlormethan: Methanol: Ammoniak; 2: 2: 1 (v/ v)
Sprühreagenz: 0,2 %-ige ethanolische Ninhydrinlösung
Entwicklung: Trockenschrank 100 °C

3.3.4 Aminosäureanalyse

3.3.4.1 System und Probenvorbereitung

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

Trennsäule: analytischer Kationenaustauscher, 125 × 4,6 mm, 6 µm,
Analysentechnik K. Grüning, München
Arbeitsdruck: ca. 60 bar
Temperatur: 48- 93 °C
Injektionsvolumen: 20- 80 µl
Elution: siehe 3.3.4.2
Flussrate: 16 ml/ h
Detektion: UV bei 570 nm und 440 nm nach Nachsäulenderivatisierung mit
Ninhydrin

Die trockenen und nach 3.3.1.1 oder 3.3.1.2 hydrolysierten Proben bzw. die in 3.3.3.2

3 Material und Methoden

erhaltenen Fraktionen in ein definiertes Volumen 0,2 M Natriumcitratpuffer pH 2,2 (siehe 3.3.4.2) aufnehmen, membranfiltrieren (RC 50, 0,2 µm) und zur Aminosäureanalyse einsetzen.

3.3.4.2 Puffer und Reagenzien

Ninhydrinlösung: 1 %-ige Lösung von Ninhydrin in einem Gemisch von Ethylenglykol und Acetatpuffer (7:3, v/v) unter Zusatz von 0,1 % Hydrindantin Dihydrat

ASA-Puffer: Natriumcitratpuffer 0,2 M, pH 2,2

Elutionspuffer:

Nummer	Zusammensetzung	Molarität [mol/l]	pH-Wert
1	Reinstwasser konserviert mit 0,1 % Tetrahydrofuran	-	-
2	Natriumcitrat	0,2	3,82
3	Natriumcitrat	0,2	4,25
4	Gemisch aus Puffer 3 und 5 (50:50)	0,7	6,25
5	Natriumcitrat	1,2	6,35
6	Natronlauge	0,4	-

3.3.4.3 Trennprogramm für Aminosäuren

Nummer	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Puffer	Ninhydrinzugabe
1	4 : 00	55	2	ON
2	0 : 05	55	3	ON
3	0 : 25	55	2	ON
4	0 : 05	55	3	ON
5	0 : 25	55	2	ON
6	0 : 05	55	3	ON
7	0 : 25	55	2	ON
8	0 : 25	55	3	ON
9	0 : 25	55	2	ON
10	0 : 10	55	3	ON
11	0 : 20	55	2	ON
12	0 : 10	55	3	ON
13	0 : 20	55	2	ON
14	19 : 00	55	3	ON
15	5 : 00	65	5	ON
16	25 : 00	90	5	ON
17	8 : 00	90	6	ON
18	8 : 00	90	2	ON
19	8 : 00	90	2 (20 %)	OFF
20	10 : 00	55	2	ON
21	0 : 00	55	2	ON

3 Material und Methoden

Nummer	Zeit [min]	Temperatur [°C]	Puffer	Ninhydrinzugabe
22	0 : 00	55	2	ON
23	1 : 00	55	2	ON

3.3.5 Flüssigchromatographie- Massenspektroskopie (LC-MS)

3.3.5.1 Gerätesystem

Anlage:	LC System 1100, Agilent (PaloAlto, USA) Elektronenstoßionisation- Time of Flight (ESI-TOF) Mariner , PerSeptive Biosystem (Framingham, USA)
LC-Parameter:	siehe 3.3.2.2 und 3.3.2.3
Flussrate:	0,8 ml/ min
Injektionsvolumen:	60- 80 µl
Detektion:	UV bei 220 und 254 nm für Hip-Arg Derivate und 312 nm für Chinoxaline; parallel dazu Dioden Array Detektor (DAD) im Bereich von 200 bis 600 nm
Massezahlen:	m/z im Bereich von 100 bis 900
Ionisierung:	Elektronenstoßionisation (ESI) im positiven Modus
Fließmittel:	<i>für Hip-Arg bzw. Boc-Arg Derivate</i> Fließmittel A: 0,1 % Ameisensäure in bidest. Wasser Fließmittel B: Methanol, HPLC rein

Parameter und Einstellungen für LC-MS sind für die Bestimmung von Hip-PIO Kapitel 8.1.1 und für Boc-PIO Kapitel 8.1.2 zu entnehmen.

für Chinoxaline:

Fließmittel: wie bei 3.3.2.3; statt Reinstwasser wird bidest. Wasser verwendet

Parameter und Einstellungen für LC-MS sind für die Bestimmung von Chinoxalinen Kapitel 8.1.3 zu entnehmen.

Für isolierte und entsalzte Verbindungen erfolgt die Messung ohne vorherige LC-Trennung.

System:	ESI-TOF-MS
Injektion:	1- 10 µl der wässrig/ methanolischen Probelösung
Ionisierung:	ESI, im positiven Modus

Detaillierte Darstellung der Parameter ist Kapitel 8.1.4 zu entnehmen.

3.3.5.2 Probenvorbereitung

Für LC-MS Messungen erfolgt die Probenvorbereitung nach 3.2.2.1 oder 3.2.2.4. Für ESI-TOF-MS muss die Probe salzfrei vorliegen und sich in einem Gemisch aus bidest. Wasser/ Methanol (50: 50, v/v) mit 1 % Ameisen- oder Essigsäure angesäuert befinden.

3.3.6 Gaschromatographie- Massenspektroskopie (GC-MS)

3.3.6.1 Gerätesystem für die Bestimmung von Kohlenhydraten

System:	Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detektor
Säule:	HP 19091J-433, HP5, 5 % Phenyl Methyl Siloxane Capillary 30,0 m x 250 µm x 0,25 µm
Temperaturprogramm:	120 °C für 5 min 200 °C für 5 min 280 °C für 10 min
Heizrate:	10 °C/ min
Split:	20:1
Flußrate:	1 ml/ min
Injektionsvolumen:	1 µl
Messmodus:	Selected Ion Monitoring (SIM)
m/z (3-Desoxypentulose)	73, 103, 147, 205, 247
m/z (interner Standard):	73, 129, 204, 217

3.3.6.2 Probenvorbereitung

Mittels GC-MS werden Kohlenhydrate in Handelsproben und Modellansätzen (siehe 3.2) als Trimethylsilylderivate (TMS) nach entsprechender Derivatisierung bestimmt.

Hierzu 1 ml Milchprobe bzw. Modellansatz, mit 100 µl des internen Standards (0,005 %-ige Lösung des α -D-Galaktopyranosids in 70 %-igem Methanol) versetzen und mit Methanol auf 10 ml auffüllen. Die Lösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur stehenlassen und anschließend filtrieren. 2 ml des Filtrates im Evaporator unter Stickstoff bis zur Trockne bei 35 °C einengen. Den trockenen Rückstand in 0,1 ml Pyridin aufnehmen, gut schütteln und direkt für die Derivatisierung einsetzen.

Derivatisierung

Die in Pyridin aufgenommene Probe mit 0,1 ml Trimethylsilylimidazol/Chlorotrimethylsilan (2:1, v/v) versetzen und für einige Sekunden schütteln. Durch Zugabe von 0,1 ml n-Hexan

und 0,1 ml Wasser kommt es zur Phasentrennung. Die organische Phase (obere Phase) abnehmen und für die GC-MS-Messung einsetzen.

Stammlösung und Kalibrierung

10 mg der nach 3.4.2.1 synthetisierten 3-Desoxypentulose in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit Methanol (HPLC-Qualität) auffüllen. Entspricht 1 mg/ ml. Zur Erstellung einer Kalibriergerade Verdünnungen entsprechend Tabelle 3.3.6.2-1 vornehmen.

Tabelle 3.3.6.2-1: Verdünnungsreihe zur Erstellung einer Kalibriergerade für die Bestimmung von 3-Desoxypentulose (3-DP) in Milch

<u>V (Standard) [µl]</u>	<u>V_{gesamt} [µl]</u>	<u>Gehalt [mg/ l]</u>
25	1000	25
50	1000	50
100	1000	100
125	1000	125
250	1000	250
500	1000	500
1000	1000	1000

3.3.6.3 Gerätesystem für die Bestimmung von Ornithin

System:	Hewlett Packard 5973 Mass Selective Detektor
Säule:	HP 19091J-433, HP5, 5 % Phenyl Methyl Siloxane Capillary 30,0 m x 250 µm x 0,25 µm
Temperaturprogramm:	70 °C für 2 min 245 °C für 37 min, 5 °C/ min 280 °C für 4 min, 15 °C/ min 315 °C für 5 min, 10 °C/ min
Injektion:	splitless
Injektionsvolumen:	2 µl
Flußrate:	1 ml/ min
Messmodus:	Selected Ion Monitoring (SIM)
m/z (Ornithin):	70, 114, 156
m/z (Norvalin):	72, 116, 158

3.3.7 Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

3.3.7.1 Gerätesystem

System:	Varian CP-3380
Säule:	Zebron Capillary GC Column, Phenomenex;

3 Material und Methoden

	ZB-AAA (10 m x 0,25 mm x 0,25 µm)
Temperaturprogramm:	110 °C auf 320 °C
Heizrate:	32 °C/ min
Split:	15:1
Flußrate:	1 ml/ min
Injektionsvolumen:	2,5 µl

3.3.7.2 Probenvorbereitung

Flüssige Lebensmittel sowie Aminosäurestandards können direkt für die Derivatisierung eingesetzt werden. Die Konzentration der Aminosäuren sollte dabei 1 mmol/l nicht überschreiten. Zur Derivatisierung der Proben Kitt EZ:Faast (Phenomenex) einsetzen. Alle Reagenzien und Hilfsmittel sind im Kit vorhanden.

Reagenzien

Reagenz 1:	Interner Standard Norvalin
Reagenz 2:	Waschlösung
Reagenz 3:	Elutionsmittel bestehend aus 3a und 3b, die im Verhältnis 2:3 immer frisch zu mischen sind
Reagenz 4:	organische Lösung 1
Reagenz 5:	organische Lösung 2
Reagenz 6:	Salzsäure 1 N

100 µl Probelösung mit 100 µl des internen Standards (Reagenz 1) in einem Probegefäß mischen. Die Lösung vorsichtig durch die SPE Spitze (Solid Phase Extraktion) mit Hilfe einer 1,5 ml Spritze ziehen. Die SPE Spitze mit 200 µl Waschlösung waschen. Die Probe mit Reagenz 3 eluieren. Dazu die SPE Spitze auf eine 0,6 ml Spritze bringen, vorsichtig mit Elutionslösung benetzen und anschließend in das Probegefäß eluieren. Zu dieser Lösung 50 µl Reagenz 4 zusetzen, 8 Sekunden schütteln und 1 Minute reagieren lassen. 100 µl Reagenz 5 zusetzen, nochmals 8 Sekunden schütteln und 1 Minute reagieren lassen. Zum Schluss 100 µl Reagenz 6 zugeben, schütteln. Es bilden sich zwei Phasen aus. Die obere, organische Phase abnehmen und 2,5 µl zur GC-FID-Messung einsetzen (3.3.7.1).

3.3.8 Spektroskopische Untersuchungen

3.3.8.1 Nuklearmagnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR)

NMR Untersuchungen wurden von Frau Dr. Gruner, Institut für Organische Chemie, TU Dresden, durchgeführt. Messungen wurden am System Bruker DRX500 (Reinstetten,

Deutschland) vorgenommen. Verschiebungen im ^1H Protonenspektrum sind angegeben relativ zum internen Standard Dimethylsulfoxid DMSO-d₆ (2,50 ppm) bzw. Deuteriumoxid HOD (4,70 ppm). Verschiebungen im Kohlenstoff ^{13}C Spektrum sind angegeben relativ zum internen Standard DMSO-d₆ (39,56 ppm) bzw. zum externen Standard Trimethylsilan für HOD.

3.3.8.2 Elementaranalyse

Die Elementaranalyse wurde von Frau A. Apitz, Institut für Organische Chemie, TU Dresden, durchgeführt. Die Analyse wurde am Euro EA 3000 Elementaranalysator (Eurovector, Milano, Italien) vorgenommen.

3.4 Darstellung von Referenzmaterial

3.4.1 Darstellung von Argininderivaten

3.4.1.1 Isolierung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

In 50 ml 0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, 335 mg N- α -Hippuryl-arginin (Hip-Arg) und 1800 mg Lactose Monohydrat (molares Verhältnis 1:5) lösen. Diese Mischung 4 h lang unter Rückfluß bei 100 °C kochen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur die dunkelbraune Flüssigkeit membranfiltrieren (RC50, 0,45 μm). Die Isolierung des Reaktionsproduktes 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) mittels semi-präparativer RP-HPLC (siehe 3.3.2) bei 220 nm Detektionswellenlänge vornehmen. Einzelne Fraktionen auf die chromatographische Reinheit mittels analytischer RP-HPLC nach der Reduzierung des Volumens am Rotationsverdampfer prüfen. Die gesammelten Hip-PIO-haltigen Fraktionen am Rotationsverdampfer bei 40 °C und 80 mbar einengen und im zweiten Reinigungsschritt mittels RP-HPLC entsalzen (siehe 3.3.2.2). Die so isolierte Verbindung gefriertrocknen und bei -20 °C für weitere Untersuchungen aufbewahren. Es wurden 160 mg Hip-PIO gewonnen. Unter Berücksichtigung der nach Elementaranalyse ermittelten Summenformel beträgt die Ausbeute an Hip-PIO 120 mg.

ESI-TOF-MS: gemessen als $[\text{MH}]^+$ m/z 434,17

Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6$ mit einer M_r 433,17

Elementaranalyse: gefunden: C= 46,57 %; H= 6,92 %; N= 12,04 %

errechnet: C= 46,54 %; H= 6,89 %; N= 12,06 %

ergibt folgende Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_6 \times 1,25 \text{CH}_3\text{COOH} \times 4 \text{H}_2\text{O}$

¹H-NMR (500 MHz, D₂O) δ [ppm]: 7,71 (1H, m, H-18/H-22); 7,44 (1H, m, H-19/H-21); 7,54 (1H, m, H-20,); 4,03 (2H, s, H-14); 4,15 (1H, d, H-10,); 1,614 und 1,795 (2H, m, H-9); 1,559 (2H, m, H-8); 3,152 (2H, t, H-7); 3,94 (1H, d, H-5); 1,599 und 1,721 (2H, m, H-1'); 1,303 (2H, m, H-2'),); 3,468 (2H, t, H-3')

¹³C-NMR (125 MHz, D₂O) δ [ppm]: 132,35 (C-17); 127,06 (C-18/C-22); 128,71 (C-19/C-21); 132,35 (C-20); 171,04 (C-16); 43,10 (C-14); 170,78 (C-13); 178,33 (C-11); 54,45 (C-10); 28,69 (C-9); 24,64 (C-8); 40,83 (C-7); 60,01 (C-5); 188,85 (C-4); 155,52 (C-2); 26,81 (C-1'); 25,93 (C-2'); 61,09 (C-3')

3.4.1.2 Synthese und Isolierung von N-δ-[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

10 mmol (288 mg) von N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin (t-Boc-Arg) und 50 mmol (1800 mg) Lactose Monohydrat in 100 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0 lösen. Zu dieser Mischung 860 mg Cellulosepulver suspendieren, gut durchmischen und gefriertrocknen. Das so gewonnene Pulvergemisch im Mörser mit Hilfe des Pistills homogenisieren, in Schott Röhren (16 mm x 160 mm, GL) mit Schraubenverschluss einfüllen und bei 100 °C in einem vorher temperierten Sandbad 4 h lang inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur die Extraktion des dunkel braunen Gemisches zehnmal mit jeweils 100 ml Methanol vornehmen. Die methanolischen Extrakte vereinigen und am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zu einem Restvolumen von ca. 10 ml einengen. Das synthetisierte t-Butoxycarbonylamino-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Boc-PIO) von dem restlichen Boc-Arg und anderen Reaktionsnebenprodukten mittels Säulenchromatographie an Kieselgel abtrennen. Hierzu 30 g Kieselgel (KG 60, 0,04- 0,063 mm) in einer Porzellanschale 2 h bei 120 °C im Trockenschrank trocknen. Kieselgel nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur in wenig Fließmittel Chloroform:Methanol (5:3, v/v) suspendieren, mehrmals umrühren, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden, und die Glassäule (40 × 1,5 cm) luftblasenfrei füllen. 2 ml des Boc-PIO-haltigen methanolischen Extraktes auf die Säule geben und mit einem Säulenvolumen an Chloroform:Methanol (5:3, v/v) Gemisch spülen. Im zweiten Elutionsschritt konzentrierte Essigsäure dem Fließmittelgemisch zusetzen, um ein Verhältnis Chloroform:Methanol:Essigsäure (5:3:0,1, v/v) zu erzielen. Fraktionierung mit 60 ml dieses Elutionsmittelgemisches durchführen. Im dritten Schritt den Anteil an Essigsäure auf 0,3 erhöhen und wie oben beschrieben vorgehen. Im vierten und letzten Schritt wird der Anteil an Essigsäure auf 0,5 erhöht. Das Volumen einzelner Fraktionen am Rotationsverdampfer auf 10 ml reduzieren und auf Anwesenheit von t-Boc-Arg und Boc-PIO mittels DC untersuchen. Hierzu Kieselgel 60 Platten, UV₂₅₄,

3 Material und Methoden

Schichtdicke 0,25 mm verwenden. Jeweils 2 µl/ Fraktion auftragen. Als Fließmittelsystem für die Dünnschichtchromatographie Chloroform:Methanol:Essigsäure (32 %) (5:3:1, v/v) verwenden. Die Visualisierung der Boc-Derivate bei 110 °C im Trockenschrank nach dem Besprühen mit 0,2 %-iger ethanolischer Ninhydrinlösung vornehmen. Boc-PIO eluiert ab einem Anteil an Essigsäure von 0,3 (v/v). t-Boc-Arg zeigt einen R_f -Wert von 0,69 und Boc-PIO von 0,91. Boc-PIO-haltige Fraktionen vereinigen und bis zu 500 µl Endvolumen am Rotationsverdampfer bei 40 °C einengen.

Zur Reinigung der Boc-PIO-haltigen Fraktionen semi-präparative RP-HPLC anwenden (siehe 3.3.2.1). Die nach der semi-präparativen RP-HPLC erhaltenen Boc-PIO-haltigen Fraktionen vereinigen, am Rotationsverdampfer bei 40 °C einengen und mit Wasser säurefrei waschen. Anschließend wässrige Boc-PIO-Lösung gefriertrocknen und weiteren Untersuchungen unterziehen. Es wurden 130 mg Boc-PIO gewonnen. Unter Berücksichtigung der nach Elementaranalyse ermittelten Summenformel beträgt die Ausbeute an Boc-PIO 111 mg.

Elementaranalyse: gefunden: C= 48,15 %; H= 7,61 %; N= 12,81 %

errechnet: C= 48,27 %; H= 7,64 %; N= 12,87 %

ergibt folgende Summenformel: $C_{16}H_{28}N_4O_6 \times 0,75 CH_3COOH \times H_2O$

Zum Gewinnen von PIO 130 mg des gewonnenen Boc-PIO in 250 ml 10 %-iger Essigsäure lösen und 4 h lang bei 70 °C unter Rückfluß kochen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur essigsäure PIO-Lösung durch mehrmalige Zugabe von 250 ml dest. Wasser am Rotationsverdampfer säurefrei waschen, gefriertrocknen und für weitere Untersuchungen bei – 18 °C aufbewahren. Es wurden 90 mg PIO gewonnen. Unter Berücksichtigung der nach Elementaranalyse ermittelten Summenformel beträgt die Ausbeute an PIO 60 mg.

ESI-TOF-MS: gemessen als $[MH]^+$ m/z 273,30

Summenformel: $C_{11}H_{20}N_4O_4$ mit einer M_r 272,30

Elementaranalyse: gefunden: C= 43,10 %; H= 7,38 %; N= 12,68 %

errechnet: C= 42,79 %; H= 7,41 %; N= 12,63 %

ergibt folgende Summenformel: $C_{11}H_{20}N_4O_4 \times 1,5 CH_3COOH \times 2,4 H_2O$

1H -NMR (500 MHz, D_2O) δ [ppm]: 4,00 (1H, t, H-10); 1,90 (4H, m; H-9, 2H; 2H, H-1'); 1,78 (2H, m, H-8,); 3,35 (2H, t, H-7); 4,40 (1H, t, H-5,); 1,50 (2H, m, H-2'); 3,50 (2H, t, H-3');

^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) δ [ppm]: 171,78 (C-11); 52,51 (C-10); 26,8 (C-9, C-1'); 23,43 (C-8); 41,40 (C-7); 156,07 (C-2); 176,15 (C-4); 59,39 (C-5); 26,16 (C-2'); 60,78 (C-3')

3.4.2 Darstellung von Zuckerabbauprodukten

3.4.2.1 Isolierung von 3-Desoxypentulose (3-DP)

Die Isolierung von 3-DP erfolgte nach *Troyano et al. (1992)*. 20 g Lactose Monohydrat in 250 ml einer 0,035 M NaOH lösen und 1 h lang unter Rückfluß bei 100 °C kochen. Die braune Lösung nach dem Abkühlen und Gefrieren gefriertrocknen und dreimal mit je 50 ml eines Ethylacetat:Methanol (5:1, v/v) Gemisches extrahieren. Die vereinigten Extrakte am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zu einem Volumen von 1 ml einengen und zur Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel einsetzen.

Säulenchromatographie

30 g Kieselgel (KG 60, 0,04- 0,063 mm) für 2 h im Trockenschrank bei 120 °C deaktivieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur die Aktivität durch Zusatz von 1,5 ml Wasser einstellen. Das Kieselgel klumpenfrei schütteln. Das so vorbereitete Kieselgel in wenig Fließmittel 2-Butanon:Ethanol (80 %-ig) (23:4, v/v) suspendieren, in eine Glassäule (40 × 1,5 cm) luftblasenfrei einfüllen, mit ca. 30 ml Fließmittel waschen und 1 ml Probe aufgeben. Die Fraktionierung und Elution mittels 2-Butanon:Ethanol (80 %-ig) (23:4, v/v) mit einer Flussrate von 0,8 ml/ min durchführen. 50 Fraktionen zu je 10 ml sammeln und einzeln dünnschichtchromatographisch auf die Anwesenheit von 3-DP untersuchen.

DC zur Untersuchung von Kohlenhydraten

DC-Platte:	Kieselgel 60, UV_{254} , Schichtdicke 0,25 mm
Kammer:	kleindimensioniert, ungesättigt
Auftragsmenge:	2 μl / Fraktion
Fließmittel:	2-Butanon:Ethanol (80 %-ig) (23:7, v/v)
Sprühreagenz:	1 g Diphenylamin in 30 ml Ethanol (96 %-ig) lösen. 1 ml Anilin und 5 ml Phosphorsäure dazugeben und auf 100 ml mit Ethanol auffüllen
Entwicklung:	Trockenschrank 100 °C

3-DP ist als ein schwach bis dunkel rosa gefärbter Fleck (konzentrationsabhängig) mit einem R_f -Wert von 0,42 in Fraktionen 28 bis 38 detektierbar. Die 3-DP-haltige Fraktionen vereinigen, einengen und nochmals auf die Reinheit mittels DC prüfen. Es wurden 26 mg

100 °C kochen. Nach 30 min 33 g (0,24 mol) Benzoylhydrazin zusetzen und das Gemisch für weitere 7 h kochen. Beim Abkühlen auf Raumtemperatur kristallisiert das Bisbenzoylhydrazon aus. Um eine vollständige Auskristallisierung des Bisbenzoylhydrazons zu erreichen, das Gemisch bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht stehen lassen. Nach dem Filtrieren über den Büchner Trichter das Kristallisat dreimal mit je 100 ml Methanol, Diethylether und anschließend nochmals Methanol waschen und lufttrocknen. Nach Umkristallisierung aus Ethanol das 3-Desoxypentosulose-bisbenzoylhydrazon nochmals bei 4 °C über Nacht stehen lassen, filtrieren und lufttrocknen. So erhält man 8 g einer weißen kristallinen Substanz, die im zweiten Schritt zur Umhydrazonierung eingesetzt wird.

Das 3-Desoxypentosulose-bisbenzoylhydrazon in 300 ml Ethanol, 50 ml dest. Wasser und 2,5 ml Essigsäure (32 %) lösen. Nach Zusatz von 12,8 ml Benzaldehyd das Gemisch 4,5 h unter Rückfluß bei 100 °C kochen. Nach Zugabe von 200 ml Wasser Ethanol und Benzaldehyd abdestillieren. Das überschüssige Bisbenzoylhydrazon absaugen und das Filtrat mit dem Universalionenaustauscher SERDOLIT MB-3 neutralisieren. Das Filtrat mit Wasser waschen, einengen und mit Aktivkohle entfärben. Man erhält ca. 2 g einer zähen gelblichen Flüssigkeit, die für weitere Untersuchungen mittels RP-HPLC nach der Derivatisierung zu Chinoxalin (siehe 3.3.2.3) einzusetzen ist. Die Charakterisierung des Isolates indirekt über sein Chinoxalin mittels RP-HPLC und nach der Syllierung zu TMS-Derivat mittels GC-MS vornehmen.

LC-MS: gemessen als $[MH]^+$ m/z 205

GC-MS gemessen im SIM- Modus: m/z 247, 275, 205, 171, 101

3.4.2.4 Isolierung von Verbindung Y

20 ml einer 0,18 M Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit 10 ml einer 0,2 %-igen wässrigen OPD Lösung versetzen und 2 h bei 100 °C im vortemperierten Sandbad in einem Schotttröhrchen (16 mm x 160 mm) inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur Probelösung membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und mittels semi-präparativer RP-HPLC mit UV Detektion bei 312 nm das Chinoxalin Y isolieren (vgl. 3.3.2.3). Die bei ca. 15 min Retentionszeit eluierende Verbindung auffangen, am Rotationsverdampfer bei 40 °C einengen und mittels analytischer RP-HPLC auf die chromatographische Reinheit prüfen. Die Charakterisierung der isolierten Verbindung mittels LC-MS und NMR vornehmen. Es wurden ca. 20 mg des Chinoxalins Y gewonnen, die direkt für die Strukturaufklärung eingesetzt wurden.

LC-MS: gemessen als $[MH]^+$ m/z 189

Verschiebungen im 1H - und ^{13}C -NMR Spektrum von Chinoxalin Y

1H -NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 8,87 (1H, s, H-3); 7,81 (1H, dd, H-7); 8,05 (1H, dd, H-8); 8,01 (1H, dd, H-9); 7,79 (1H, dd, H-10); 3,02 (2H, t, H-1'); 1,95 (2H, t, H-2'); 3,50 (3H, t, H-3')

^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ [ppm]: 157,82 (C-2); 146,57 (C-3); 140,64 (C-5); 141,52 (C-6); 130,21 (C-7); 128,93 (C-8); 128,61 (C-9); 129,24 (C-10); 32,23 (C-1'); 31,77 (C-2'); 60,28 (C-3')

3.4.2.5 Synthese von 3,4-Didesoxypentosulose (3,4-DDPs)

Die 3,4-Didesoxypentosulose wird als 2-Hydroxy-3-tetrahydropyranon nach *Charlesworth & Giesinger (1956)* synthetisiert. Dazu 1 ml 2,3,3-Trichlortetrahydro-2H-pyran und 2,6 g Na₂CO₃ in 100 ml dest. Wasser lösen und 10 h bei 35 °C im Ölbad unter Rühren inkubieren. Die dunkel lila gefärbte Flüssigkeit dann zur Trockne am Rotationsverdampfer bei 40 °C einrotieren und in 150 ml einer 1 %-igen wässrigen NaOH Lösung wieder aufnehmen. Dieses Gemisch für weitere 30 min bei 35 °C inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur die Reaktionsmischung mit 1 N HCl neutralisieren und am Rotationsverdampfer bei 40 °C zur Trockne einengen. Das Rohprodukt dreimal mit je 50 ml Methanol extrahieren, die vereinigten Extrakte bis zu einem Volumen von 1 ml einengen und an einer Kieselgelsäule analog zur Isolierung von 3-Desoxypentulose fraktionieren (vgl. 3.4.2.1). Fraktionen mittels DC wie in 3.4.2.1 beschrieben auf Anwesenheit von Kohlenhydraten prüfen. 3,4-Didesoxypentosulose eluiert in Fraktionen 10 bis 16 mit einem R_F-Wert von 0,9 (dunkelblau). Die vereinigten 3,4-DDPs-haltigen Fraktionen bis zur Trockene am Rotationsverdampfer einengen. Man erhält 330 mg einer gelben, zähen und karamellartig riechenden Flüssigkeit. Das Isolat auf die Reinheit mittels RP-HPLC nach der Umsetzung zum Chinoxalin und mittels GC-MS nach der Umsetzung zum entsprechenden TMS-Derivat prüfen.

LC-MS: gemessen als $[MH]^+$ m/z 189

GC-MS gemessen im SIM- Modus: m/z 188, 85, 103, 131, 117

3.5 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von PIO

3.5.1 Inkubation von N- α -Hippuryl- bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin mit Lactose und Lactoseabbauprodukten

3.5.1.1 Inkubation von N- α -Hippuryl-L-arginin mit Lactose

Wie in 3.2.3.3 beschrieben, in der ersten Untersuchungsreihe Hip-Arg in verschiedenen molaren Verhältnissen mit Lactose Monohydrat in Schottröhrchen mit Schraubverschluss mischen (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) und bis zu 8 h lang bei 100 °C inkubieren. Die molaren Verhältnisse Hip-Arg:Lactose betragen 1:5, 1:10, 1:30, 1:50 und 1:100. Jeweils 1 ml der so inkubierten Lösung nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur membranfiltrieren (RC50, 0,45 μ m) und mittels RP-HPLC vermessen (siehe 3.3.2.2).

In der zweiten Untersuchungsreihe 1 ml 10 mmolarer Lactoselösung in Schottröhrchen mit Schraubverschluss bis zu 4 h lang im vortemperierten Sandbad bei 100 °C im Trockenschrank erhitzen und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 1 ml einer 1 mmolaren Hip-Arg-Lösung versetzen. Das Gemisch erneut bei 100 °C bis zu 2 h lang erhitzen, wobei die Probenentnahme in einem 30-minütigen Rhythmus vorzunehmen ist. Nach dem Membranfiltrieren (RC50, 0,45 μ m) Probelösungen mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 220 nm vermessen (siehe 3.3.2.2).

Parallel zu jedem Inkubationsansatz Vermessung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Form von Chinoxalinen mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 312 nm durchführen (siehe 3.3.2.3).

3.5.1.2 Inkubation von N- α -Hippuryl-L-arginin mit anderen Kohlenhydraten

Wie in 3.5.1.1 beschrieben, jeweils zwei Probenreihen mitführen. In der ersten Probenreihe je 1 ml einer 1 mmolaren Hip-Arg Lösung (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) mit je 1 ml einer 10 mmolaren Lösung Galactose, Raffinose, Lactulose und Maltose in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 in einem Schottröhrchen mit Schraubverschluss mischen und im vortemperierten Sandbad im Trockenschrank bei 100 °C bis zu 8 h lang inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur und Membranfiltration Messung der Hippurylderivate mittels RP-HPLC vornehmen (siehe 3.3.2.2).

Parallel zur Messung von Hippurylderivaten Messung von Chinoxalinen in denselben Probelösungen nach entsprechender Derivatisierung (vgl. 3.3.2.3) durchführen.

Die zweite Probenreihe enthält nur Kohlenhydratlösungen. Statt Hip-Arg 1 ml dest. Wasser zusetzen und Proben wie oben beschrieben inkubieren. Die Messung des

Dicarbonylspektrums über die Messung der entsprechenden Chinoxaline nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin vornehmen (vgl. 3.3.2.3).

3.5.1.3 Inkubation von N- α -Hippuryl- bzw. N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin mit Lactose-abbauprodukten

Jeweils 1 ml einer 1 mmolaren Hip-Arg Lösung (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) mit 3-DP, 3-DPs und 3,4-DDPs (siehe 3.4.2) in verschiedenen molaren Verhältnissen in Schottröhrchen mit Schraubverschluss mischen und in einem vortemperierten Sandbad bei 100 °C bis zu 2 h lang inkubieren. Die molaren Verhältnisse so wählen, dass 3-DP, 3-DPs oder 3,4-DDPs im Unterschuss, äquimolar und im Überschuss vorliegen (1:0,2, 1:0,5, 1:1, 1:10, 1:50, 1:100). Die Proben nach der Membranfiltration (RC50, 0,45 μ m) mittels RP-HPLC auf die Bildung von Hippurylderivaten vermessen (siehe 3.3.2.2).

Da die Molarität der synthetisierten 3-DPs und 3,4-DDPs nicht bestimmt werden konnte, 10 μ l, 20 μ l, 40 μ l, 60 μ l, 100 μ l und 200 μ l 3-DPs bzw. 3,4-DDPs-Lösung zu 1 ml einer 1 mmolaren Lösung Hip- bzw. Boc-Arg zusetzen und bis zu 2 h bei 100 °C inkubieren. Hippurylderivate mittels RP-HPLC vermessen. PIO mittels ASA bei 570 und 440 nm nach der essigsauren Hydrolyse der Boc-Gruppe vermessen (vgl. 3.4.1.2).

Um den Abbau der C5-Carbonylverbindungen zu verfolgen, alle Probelösungen nach der Derivatisierung mit OPD auf Chinoxaline mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 312 nm untersuchen (siehe 3.3.2.3).

3.5.1 Inkubation von 3,4-Didesoxypentosulose mit Casein

Casein wie in 3.2.2.2 beschrieben isolieren und Caseinstammlösung herstellen. Hierzu 240 mg Casein in 50 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 lösen. Je 500 μ l dieser Lösung in Schottröhrchen mit Schraubverschluss geben, mit 40, 60, 80 und 100 μ l der Lösung an 3,4-Didesoxypentosulose (vgl. 3.4.2.5) versetzen und mit 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 auf 1 ml auffüllen. So hergestellte Modellansätze bei 100 °C in einem vortemperierten Sandbad in verschlossenen Röhrchen 1 h und 2 h inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur Inkubationsansätze enzymatischer (vgl. 3.3.1.2) bzw. Säurehydrolyse (vgl. 3.3.1.1) unterziehen und mittels Aminosäureanalyse untersuchen.

3.6 Strukturaufklärung der Hydrolyseprodukte von PIO

3.6.1 Isolierung der Säurehydrolyseprodukte von PIO

Wie in 3.4.1.2 beschrieben, Boc-PIO aus dem Ansatz t-Boc-Arg:Lac (1:5 molares Verhältnis) synthetisieren. Den methanolischen Extrakt des Syntheseansatzes ohne vorherige Reinigung an der semi-präparativen RP-HPLC einer totalen Säurehydrolyse (vgl. 3.3.1.1) unterziehen und auf die Hydrolyseprodukte von PIO mittels Dünnschichtchromatographie und Aminosäureanalyse untersuchen. Drei Hauptabbauprodukte aus der Säurehydrolyse von PIO sind detektierbar. Diese werden als Verbindungen A, B und C gekennzeichnet.

Die Isolierung einzelner Hydrolyseprodukte mittels semi-präparativer Ionenaustauschchromatographie durchführen (siehe 3.3.3). Den Kationentauscher DOWEX H⁺-Form wie in 3.3.3.1 beschrieben mit 6 N HCl waschen, mit dest. Wasser den pH-Wert auf 4 bis 5 einstellen und 50 ml des säurehydrolysierten und in Citratpuffer B wieder aufgenommenen Boc-PIO Syntheseansatzes auf die Säule geben. Waschen des Austauschharzes mit Citratpuffer B und die Fraktionierung mit Citratpuffer C vornehmen. Hierzu 200 Fraktionen zu je 10 ml mit Hilfe eines Fraktionssammlers auffangen und einzeln auf die Anwesenheit ninhydrinpositiver Verbindungen mittels Tüpfeltest und DC untersuchen (vgl. 3.3.3.3 und 3.3.3.4). Ninhydrinpositive Fraktionen einer Aminosäureanalyse unterziehen. PIO eluiert in den Fraktionen 18 bis 40 mit einem R_F-Wert von 0,85. Das Hydrolyseprodukt A ist ab Fraktion 35 bis 43 detektierbar. Das Hydrolyseprodukt B ist in Fraktionen 45 bis 65 zu finden. Verbindung C eluiert ab Fraktion 80 und ist ab Fraktion 95 mit Arginin verunreinigt.

Isolierung des Hydrolyseproduktes B

Fraktionierung am stark sauren Kationenaustauscher wie oben beschrieben vornehmen. Fraktionen 45 bis 65 vereinigen und mittels DC und Aminosäureanalyse untersuchen. Die Verbindung B weist einen R_F-Wert von 0,36 und eluiert mit einer Retentionszeit von 52 min im Aminosäurechromatogramm. Vereinigte Fraktionen am Rotationsverdampfer bei 40 °C auf ca. 10 ml einengen und zur Entsalzung wie in 3.3.3 beschrieben geben. Das entsalzte Produkt säurefrei waschen, zur Trockene einengen und für weitere Untersuchungen einsetzen.

3.6.2 Untersuchungen zur Bildung von Ornithin

Zur Untersuchung der Bildung von Ornithin Modellansätze aus Casein, Casein und Lactose und Casein und Glucose heranziehen. Casein wie in 3.2.2.2 isolieren und eine Caseinstammlösung herstellen.

Casein/ Glucose (molares Verhältnis 1:30). 155 mg Glucose in 10 ml Caseinstammlösung suspendieren.

Casein/ Lactose (molares Verhältnis 1:30). 291 mg Lactose in 10 ml Caseinstammlösung suspendieren.

Ornithinstammlösung (1 mmol). 16,9 mg Ornithin in 100 ml Reinstwasser lösen.

Jeweils 1 ml der Caseinstammlösung, Casein/ Glucose (1:30 molares Verhältnis) und Casein/ Lactose Lösung (1:30 molares Verhältnis) in einem Schottröhrchen mit Schraubverschluss im vortemperierten Sandbad bei 100 °C für 0, 2, 4 und 24 h lang inkubieren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur eine Caseinfällung durch Zugabe von 400 µl einer 1 N HCl vornehmen. Proben bei 3000 U/ min für 10 min zentrifugieren, den Überstand verwerfen und Proben gefriertrocknen. Jeweils 5 mg der jeweiligen Caseinolate in Schottröhrchen mit Schraubverschluss einwiegen, mit 5 ml der 6 N HCl versetzen und der Säurehydrolyse unterziehen (23 h, 110 °C). Jeweils 1 ml der Säurehydrolysate zur Trockene einengen, in 50 µl Reinstwasser wieder aufnehmen und mit Hilfe des EZ:faast Kits für Säurehydrolysate derivatisieren.

Zur Untersuchung des Ornithins nach enzymatischer Hydrolyse 500 µl der jeweiligen Modellansätze im Vakuumkonzentrator zur Trockene einengen, in 1 ml 0,02 N HCl aufnehmen und wie in 3.3.1.2 beschrieben enzymatisch Hydrolysieren. Die enzymatischen Hydrolysate entsprechend 3.3.7.2 derivatisieren und mittels GC-MS (vgl. 3.3.6.3) hinsichtlich der Ornithinbildung untersuchen.

3.6.3 EZ:faast für Säurehydrolysate

Reagenzien

Reagenz 1:	Interner Standard Norvalin (0,2 mM)
Reagenz 2:	Lösung Na ₂ CO ₃ (1 M)
Reagenz 3:	Elutionsmittel bestehend aus 3a und 3b, die im Verhältnis 2:3 immer frisch zu mischen sind
Reagenz 4:	organische Lösung 1 in Chloroform
Reagenz 5:	organische Lösung 2 in iso-Octan
Reagenz 6:	Lösungsmittel bestehend aus 20 % Chloroform und 80 % iso-Octan

Zur Bestimmung von Ornithin mittels EZ:faast 50 µl der Säurehydrolysate (vgl. 3.6.2) mit 100 µl des Reagenzes 2 (Na₂CO₃) zur Einstellung des pH-Wertes versetzen. Zu 25 µl dieser Lösung 100 µl des internen Standards (Norvalin) zugeben und in ein 1 ml CLR Glas Shell

Vial (im Kit vorhanden) pipettieren. Die Lösung mit einer im Kit enthaltenen 1,5 ml Spritze auf eine SPE Spitze aufziehen. Die SPE Spitze mit 200 µl bidest. Wasser waschen. Zur Entfernung des Wassers Luft in die Spitze ziehen bis die gesamte Lösung über dem Filter steht. Die SPE Spitze anschließend auf eine 0,6 ml Spritze (im Kit vorhanden) bringen und die Probe mit 200 µl Elutionslösung (Reagenz 3) in das Probengefäß eluieren. In das Probengefäß 50 µl des Reagenzes 4 zusetzen, 8 Sekunden schütteln und 1 Minute reagieren lassen. Diesen Vorgang noch einmal wiederholen. Danach 100 µl des Reagenzes 5 zugeben, 8 Sekunden schütteln und 1 Minute reagieren lassen. Es bilden sich zwei Phasen aus. 100 µl der oberen, organischen Phase abnehmen, in ein Vial (im Kit enthalten) füllen und mit Hilfe von N₂ zur Trockene einengen. Den trockenen Rückstand in 100 µl des Reagenzes 6 wieder aufnehmen und in ein 100 µl Vialeinsatz überführen. Die so derivatisierten Proben mittels GC-MS auf Ornithin untersuchen (vgl. 3.3.6.3).

3.7 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln

3.7.1 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milchprodukten

Wie in 3.2.1 beschrieben, wurden verschiedene handelsübliche Milch- und Milchmodertränke auf den Gehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen hin untersucht. Dazu die in 3.3.2.3 aufgeführte RP-HPLC Meßmethode zur Bestimmung von Chinoxalinen anwenden. Die Kalibrierung mit der Stammlösung (SL), bestehend aus 3-Desoxyglucosulose (3-DG), Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO) und 3-Desoxypentosulose (3-DPs) in den in Tabelle 3.7.1-1 aufgeführten Konzentrationen bzw. in Tabelle 3.7.1-2 aufgeführten Verdünnungen vornehmen.

Zur Herstellung der Stammlösung (SL) einzelne Standardsubstanzen mit Reinstwasser auf die Ausgangskonzentrationen verdünnen.

GO: 70 µl einer 40 %-igen wässrigen Glyoxal Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 100 ml Maßkolben pipettieren und mit Reinstwasser auffüllen. Entspricht 3,8 mmol/l

MGO: 100 µl einer 40 %-igen wässrigen Methylglyoxal Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 100 ml Maßkolben pipettieren und mit Reinstwasser auffüllen. Entspricht 4,7 mmol/l

3 Material und Methoden

3-DG: 60 mg der 3-Desoxyglucosulose (Syntheseprodukt, Dr. Krause, TU Dresden) in einen 100 ml Maßkolben einwiegen und auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen. Entspricht 3,7 mmol/l

3-DPs: 100 mg der 3-Desoxypentosulose (Syntheseprodukt, Rättich, TU Dresden) in einen 100 ml Maßkolben einwiegen und auf 100 ml mit Reinstwasser auffüllen. Entspricht 7,5 mmol/l

Die Isolierung von 3-Desoxypentosulose erfolgt nach 3.4.2.3. Für quantitative Auswertungen eine weitere Reinigung ohne vorherige Derivatisierung mittels semi-präparativer RP-HPLC entsprechend 3.3.2.3 vornehmen. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde keine Reinheitsprüfung, ausgenommen chromatographische Reinheit nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin, vorgenommen. Konzentrationsangabe erfolgt unter Annahme einer 80 %-igen Reinheit der isolierten Verbindung.

Tabelle 3.7.1-1: Zusammensetzung der Stammlösung (SL) zur Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milch und Milchprodukten

Substanz	Ausgangskonzentration [mmol/l]	Einsatz-Volumen [ml]	Gesamt-Volumen [ml]	Endkonzentration [mmol/l]
GO	3,8	1,6	6,0	1,00
MGO	4,7	1,8	6,0	1,40
3-DG	3,7	1,6	6,0	1,00
3-DPs	7,5	1,0	6,0	1,25

Für die Kalibrierung ergibt sich somit in Tabelle 3.7.1-2 dargestellte Verdünnungsreihe:

Tabelle 3.7.1-2: Verdünnungsreihe für die Kalibrierung aus der Stammlösung (SL)

V(SL) [μ l]*	V(Gesamt) [μ l]	Gehalt (GO) [mg/l]	Gehalt (MGO) [mg/l]	Gehalt (3-DG) [mg/l]	Gehalt (3-DPs) [mg/l]
250	1000	14,7	25,64	40,0	33,25
150	1000	8,82	15,38	24,0	19,95
50	1000	2,94	5,13	8,0	6,65
10	1000	0,59	1,02	1,6	1,33
5	1000	0,29	0,51	0,8	0,67

* die SL enthält die in der Tabelle 3.7.1-1 aufgeführten Konzentrationen

3 Material und Methoden

Die Matrixkalibrierung an einer Rohmilch mit in der Tabelle 3.7.1-3 aufgeführten Zusätzen an SL durchführen.

Probenvorbereitung

2 ml einer Milchprobe mit Methanol in einem 10 ml Maßkolben auf 10 ml auffüllen und 1 h bei Raumtemperatur stehen lassen. Nach der Abtrennung der gefällten Proteine durch Filtration 1 ml des Filtrates für die Derivatisierung mittels o-Phenylendiamin (siehe 3.3.2.1) einsetzen. Proben membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und auf die Chinoxaline untersuchen.

Matrixkalibrierung und Bestimmung der Wiederfindung

Für die Matrixkalibrierung Rohmilch mit in Tabelle 3.7.1-3 aufgelisteten Volumina an SL versetzen, wie oben beschrieben aufarbeiten und die Wiederfindung einzelner 1,2-Dicarbonylverbindungen in der Milchmatrix ermitteln (vgl. 8.2.1.1).

Tabelle 3.7.1-3: Konzentrationen an Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), 3-Desoxyglucosulose (3-DG) und 3-Desoxypentosulose (3-DPs) zugesetzt der Rohmilch für die Matrixkalibrierung

V (SL) [µl]	GO [mg/l Milch]	MGO [mg/l Milch]	3-DG [mg/l Milch]	3-DPs [mg/l Milch]
100	4,64	3,60	8,10	8,25
40	1,86	1,44	3,24	3,30
20	0,93	0,72	1,62	1,65
10	0,46	0,36	0,81	0,82
5	0,23	0,18	0,40	0,41

3.7.2 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honigen

3.7.2.1 Handelsproben

Die in der Tabelle 3.7.2.1-1 aufgelisteten Honigproben wurden auf den Gehalt an 3-DG, GO und MGO hin untersucht. Die mit * gekennzeichneten Proben wurden für die mikrobiologischen Tests verwendet.

Tabelle 3.7.2.1-1: Honig Handelsproben

Nummer	Honigbezeichnung	Hersteller
1	Robinienhonig	Imkerverein Dresden
2	Frühlingsblüte	Imkerverein Dresden
3	Sommertracht	Imkerverein Dresden
4	Sonnenblume	Imkerverein Dresden
5	Sommerblüte	Imkerverein Dresden
6	Sommerblüte	Imkerverein Dresden
7	Waldhonig	Imkerverein Dresden
8	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
9	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
10	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
11	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
12	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
13	Blütenhonig	Imkerverein Dresden
14	Blüte I	Imkerverein Dresden
15	Blüte II	Imkerverein Dresden
16	Blüte III	Imkerverein Dresden
17	Sommertracht mit Linde	Imkerverein Dresden
18	Blütenhonig Nr. 10	Imkerverein Dresden
19	Blütenhonig Nr. 10	Imkerverein Dresden
20	Blütenhonig Nr. 10	Imkerverein Dresden
21	Wabenhonig	Imkerverein Dresden
22	Bienenzuckerlösung	Imkerverein Dresden
23	Imkerhonig	Aldi
24	Pinienhonig	Biogold
25	Sommerblüte feine Auslese	Langnese
26	Waldhonig*	Breitsamer
27	Akazienhonig	Breitsamer
28	Sonnenblumenhonig	Breitsamer
29	Kanadischer Raps-Klee Honig	Fürsten Reform
30	Sommerblütenhonig*	Maribel/ Lidl
31	Akazien Blütenzarter	Eden
32	Manuka-Wald Honig*	Nook
33	Deutscher Honig "Klee"	Imkerverein Dresden
34	Deutscher Bienenhonig "Frühlingsblüte	Imkerverein Dresden
35	Deutscher Honig "Linde"	Imkerverein Dresden
36	Deutscher Bienenhonig "Waldblüte"	Imkerverein Dresden
37	Deutscher Honig "Luzerne"	Imkerverein Dresden
38	Waldblüten Honig 2*	Imkerverein Dresden
39	Rapshonig	Imkerverein Dresden
40	Jahre gelagerter Honig	Imkerverein Dresden
41	Manuka Honey*	Honey New Zealand
42	Manuka Aktive Honey*	Honey New Zealand
43	Manuka UMF 10+ Honey*	Honey New Zealand
44	Manuka UMF 20+ Honey*	Honey New Zealand
45	Wild Flora Honey*	Honey New Zealand
46	Wild Flora 10+ Honey*	Honey New Zealand
47	Rewarewa Honey*	Honey New Zealand

3 Material und Methoden

Nummer	Honigbezeichnung	Hersteller
48	Rewarewa 10+ Honey*	Honey New Zealand
49	Clover Honey*	Honey New Zealand
50	Organic Clover Honey*	Honey New Zealand
51	Pohutukawa Honey*	Honey New Zealand
52	Tawari Honey *	Honey New Zealand

Honigproben aus Neu Zeeland wurden käuflich erworben über www.neuseelandhaus.de.

3.7.2.2 Probenvorbereitung und das analytische System

Zur Bestimmung von Dicarbonylverbindungen eine 15 %-ige Honiglösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,5, herstellen und mit OPD derivatisieren.

Derivatisierung von Honigproben

1 ml einer 15 %-igen Honiglösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,5, mit 0,3 ml 1 %-iger o-Phenylendiamin Lösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,5, und 0,3 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,5, versetzen und 12 h im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen lassen. Proben membranfiltrieren (RC50, 0,45 µm) und mittels RP-HPLC auf die Chinoxaline untersuchen.

Stammlösung und Kalibrierung

Zur Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in Honigen Standards Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO) und 3-Desoxyglucoson (3-DG) wie in Tabelle 3.7.2.2-1 dargestellt zur Herstellung einer Stammlösung verwenden. Dazu einzelne Standardsubstanzen mit Reinstwasser auf die Ausgangskonzentrationen verdünnen.

GO: 100 µl der 40 %-igen GO-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 10 ml Maßkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Daraus 150 µl entnehmen, in einen weiteren 10 ml Maßkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Entspricht 0,8 mmol/l.

MGO: 100 µl der 40 %-igen MGO-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 10 ml Maßkolben pipetieren und mit dest. Wasser auffüllen. Daraus 900 µl entnehmen, in einen weiteren 10 ml Maßkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Entspricht 4,3 mmol/l.

3-DG: 38,8 mg 3-DG (Syntheseprodukt, Dr. Krause, TU Dresden) in einen 25 ml Maßkolben einwiegen und mit dest. Wasser auffüllen. Entspricht 9,6 mmol/l.

Einzelne Standards, GO, MGO und 3-DG entsprechend Tabelle 3.7.2.2-1 mischen, um in Tabelle 3.7.2.2.-1 dargestellten Gehalte einzelner Verbindungen zu bekommen.

Tabelle 3.7.2.2-1: Verdünnungsreihe für die Kalibrierung der α -Dicarbonylverbindungen

Verdünnung	Stammlösung			
	3-DG [ml]	GO [ml]	MGO [ml]	H ₂ O [ml]
1	1,0	2,0	2,0	0,0
2	0,8	1,6	1,0	1,6
3	0,6	1,2	0,5	2,7
4	0,4	0,8	0,25	3,55
5	0,2	0,4	0,1	4,3
6	0,1	0,2	0,01	4,69

Die zur Stammlösung zugehörigen Konzentrationen der jeweiligen Standardsubstanz sind in Tabelle 3.7.2.2-2 dargestellt.

Tabelle 3.7.2.2-2: Endkonzentrationen der α -Dicarbonylverbindungen in der jeweiligen Kalibrierverdünnung

Verdünnung	3-DG [mmol/ l]	GO [mmol/ l]	MGO [mmol/ l]
1	1,91	0,32	1,707
2	1,53	0,26	0,854
3	1,15	0,19	0,427
4	0,76	0,13	0,213
5	0,38	0,07	0,085
6	0,19	0,03	0,009

Die Messung von Chinoxalinen mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 312 nm (vgl. 3.3.2.3) vornehmen. Zur Bestimmung von Chinoxalinen in Honigen Messmethode bzw. den Gradientenverlauf entsprechend Tabelle 3.7.2.2-3 anwenden.

Tabelle 3.7.2.2-3: Gradient zur Bestimmung von Chinoxalinen in der Honigmatrix mittels RP-HPLC

Zeit [min]	Gradient/ Zeitverlauf						
	0	2	22	37	39	46	48
Eluent A [%]	20	20	40	100	100	20	20
Eluent B [%]	80	80	60	0	0	80	80

3.7.3 Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) wird mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 283 nm wie in Kapitel 3.3.2.4 beschrieben bestimmt. Dazu 10 %-ige Honiglösungen in Wasser herstellen

und diese direkt auf HMF-Gehalt untersuchen. Kalibrierung mit einer Stammlösung von 2,40 mg HMF/ l im Bereich von 0,24 mg/ l bis 2,40 mg/ l durchführen (siehe Tabelle 3.7.3-1). Dazu Stammlösung angefangen bei 0,2 ml mit Reinstwasser auf 2 ml Endvolumen verdünnen.

Tabelle 3.7.3-1: Verdünnungsreihe für die Kalibrierung von HMF

Stammlösung HMF [ml]	Reinstwasser [ml]	c HMF [mg/ l]
2,0	0	2,40
1,6	0,4	1,92
0,8	1,2	0,96
0,4	1,6	0,48
0,2	1,8	0,24

3.7.4 Antibakterielle Eigenschaften von Honigen

3.7.4.1 Abschätzung des Wasserstoffperoxidgehaltes

Zur Abschätzung des H₂O₂-Gehaltes werden Merckoquant Peroxidstäbchentests 0-25 und 0-100 mg/ l verwendet. Diese zeigen folgende Konzentrationsbereiche an: 0-0,5-2-5-10-15 mg/ l und 0-1-3-10-30-100 mg/ l.

4 g Honig in 2 ml 0,4 M Phosphatpuffer, pH 6,5, lösen und mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen. Um eine 20 %-ige Honiglösung zu bekommen, 5 ml dieser Lösung nochmals auf 10 ml mit dest. Wasser auffüllen. Die so hergestellte Honiglösung 60 min in einem temperierten Wasserbad bei 37 °C im Dunkeln inkubieren und zur Ermittlung des H₂O₂-Gehaltes ein Peroxidteststäbchen für 1 s direkt in die Lösung halten. Anhand der Farbintensität und durch Vergleich mit den auf der Verpackung angegebenen Färbungen den Gehalt an H₂O₂ abschätzen.

3.7.4.2 Antibakterielle Eigenschaften der 1,2-Dicarbonylverbindungen

Zum Prüfen der antibakteriellen Aktivität einzelner Dicarbonylverbindungen in Testlösungen, sowie in verdünntem Honig die in Tabelle 3.7.4.1-1 aufgelisteten Mikroorganismen verwenden. Die Mikroorganismenkulturen wurden vom Institut für Mikrobiologie, TU Dresden, zur Verfügung gestellt. Alle Tests zur Prüfung der antibakteriellen Aktivität der Modelllösungen und Honige wurden am Institut für Mikrobiologie, TU Dresden, durchgeführt.

Tabelle 3.7.4.2-1: Die für die mikrobiologischen Tests verwendete Mikroorganismen

Mikroorganismus	Art
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positives Bakterium
<i>Candida albicans</i>	Hefe
<i>Candida tropicalis</i>	Hefe
<i>Escherichia coli</i>	Gram-negatives Bakterium
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram-negatives Bakterium
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefe
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positives Bakterium
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Hefe

Die Beurteilung der antibakteriellen Wirkung der Honige erfolgte mittels Lochagardiffusionstest. Die Herstellung der Agarplatten so durchführen, dass die Komponenten der jeweiligen Nährmedien in dest. Wasser nach der jeweiligen Rezeptur vollständig gelöst sind. Die Nährlösung 20 min bei 121 °C autoklavieren, danach auf ca. 45 °C abkühlen und in die sterile Petrischalen gießen. Die so gegossenen Gele verfestigen sich beim Abkühlen.

LB (Luria-Bertani)–Medium

Zusammensetzung pro Liter:

10 g NaCl

10 g Pepton (Trypton)

5 g Hefeextrakt

20 g Agar

pH 7,5

LB-Agar kann zum Kultivieren der meisten Bakterienstämme eingesetzt werden.

M9-Minimalmedium

Zusammensetzung pro 300 ml:

6 g Agar (autoklaviert)

0,6 ml 1 M MgSO₄ (filtersterilisiert)

30 ml 1 M CaCl₂ (filtersterilisiert)

6 ml 20 % Glucose (autoklaviert)

60 ml 5 x M9 Salze (filtersterilisiert)

Zusammensetzung der M9 Salze pro Liter:

64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

15 g KH_2PO_4

2,5 g NaCl

5,6 g NH_4Cl

YPD (yeast extract-peptone-dextrose) -Medium

Zusammensetzung pro Liter:

10 g Hefeextrakt

20 g Pepton (Trypton)

20 g Glucose

20 g Agar

pH 5,5 - 6

3.7.4.3 Probenaufarbeitung und die Durchführung des Lochgardiffusionstestes

Auf den vorbereiteten Nähragar (siehe 3.7.4.1) 100 μl der Mikroorganismenkultur gleichmäßig ausspateln. Im Agar mit einem Korkbohrer Löcher ausstanzen (\varnothing 1 cm) und diese mit 150 μl Probe beimpfen. Nach 20 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C die antibakterielle Wirksamkeit der Proben bestimmen. Hierzu den entstandenen Hemmhofradius messen und die Hemmung in mm Einheiten definieren. Standardsubstanzen 3-DG, GO, MGO und HMF auf das antibakterielle Potential prüfen, sowie Honige 26, 30 32, 38 und 42 bis 48 in verschiedenen Verdünnungen.

Ermittlung der MIC-Werte

MIC-Wert (Minimum Inhibitory Concentration) ist die minimale Konzentration einer Substanz, die notwendig ist, um noch eine detektierbare antibakterielle Wirkung zu erzielen. MIC-Wert für einzelne Standardsubstanzen, sowie für oben genannte Honige ermitteln. Hierzu Standards wie in Tabelle 3.7.4.2-2 einsetzen. Gewählte Konzentrationen der Standardsubstanzen entsprechen den in Honigen bestimmten Gehalten.

3-DG: 93 mg 3-Desoxyglucosulose (Syntheseprodukt, Dr. Krause, TU Dresden) in einen 10 ml Maßkolben einwiegen und mit dest. Wasser auffüllen. Entspricht 57 mmol/l

GO: 100 μl der 40 %-igen GO-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 10 ml Maßkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Diese Lösung 1 zu 5 mit dest. Wasser verdünnen. Entspricht 10 mmol/l.

3 Material und Methoden

MGO: 100 µl der 40 %-igen MGO-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in einen 10 ml Maßkolben pipetieren und mit dest. Wasser auffüllen. Daraus 850 µl entnehmen, in einen 5 ml Maßkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Entspricht 8,0 mmol/l

Tabelle 3.7.4.2-2: Ausgangskonzentrationen von 3-DG, GO und MGO zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität mittels Lochagardiffusionstest

Standardsubstanz	c [mmol/ l]	c [mg/ kg]
3-DG	57	9200
GO	10	580
MGO	8	576

Honigproben ausgehend von 80 % (v/v) in Schritten von 5 % (v/v) in dest. Wasser verdünnen und auf antibakterielle Aktivität prüfen. Honige so weit verdünnen, bis keine Hemmung mehr sichtbar ist.

4 Ergebnisse und Diskussion

Während der Herstellung von Lebensmitteln finden verschiedene chemische Reaktionen statt, die zum Verlust an essentiellen Aminosäuren führen. Aus der Literatur ist es bekannt, dass Seitenketten des proteingebundenen Lysins und Arginins besonders reaktionsfreudig sind. Im Vergleich zu Lysin ist über die Derivatisierung von Arginin während der Maillard-Reaktion bislang wenig bekannt. *Henle et al. (1994, 2000)* zeigten, dass der Argininverlust bei hitzebehandelten Lebensmitteln bis zu 30 % betragen kann. Insbesondere in Laugengebäck werden 60-70 % des vorhandenen Arginins während des Backens abgebaut. Jedoch sind die bisher beschriebenen Argininderivate (vgl. Abb. 2.3.2-1) nicht allein verantwortlich für diese Argininverluste.

Bestandsaufnahmen hinsichtlich des Gehaltes an Arginin in verschiedenen Milchproben nach Säurehydrolyse bzw. nach enzymatischer Hydrolyse liefern zwei voneinander stark abweichende Ergebnisse. Es zeigte sich, dass nach enzymatischer Hydrolyse weniger Arginin wiedergefunden wird als nach Säurehydrolyse. In Abbildung 4-1 ist zu sehen, dass bei derselben Milchpulverprobe nach Erhitzung unterschiedliche Argininverluste abhängig von der Hydrolysemethode messbar waren.

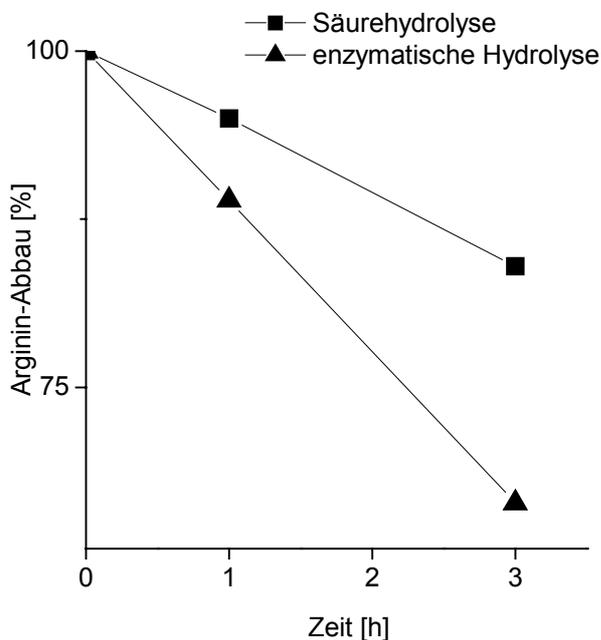


Abbildung 4-1: Argininabbau in Milchpulver nach Erhitzung bei 100 °C, bestimmt mittels Aminosäureanalyse nach enzymatischer bzw. Säurehydrolyse

Nach drei Stunden Erhitzungszeit bei 100 °C findet man nach Säurehydrolyse 84 % des Ausgangsgehaltes an Arginin, wogegen nach enzymatischer Hydrolyse nur noch 66 % zu bestimmen sind. Man kann davon ausgehen, dass während der Herstellung oder Erhitzung

von Lebensmitteln säurelabile Argininderivate entstehen, die während der Säurehydrolyse teilweise wieder zu Arginin abgebaut werden und somit mit bisher angewandten Methoden nicht miterfasst werden konnten. Untersuchungen zur Derivatisierung von Arginin wurden mit Hilfe von Modellansätzen nach direkter Umsetzung von Arginin mit Monosacchariden oder α -Dicarbonylverbindungen vorgenommen (*Sopio & Lederer, 1995; Schwarzenbolz et al., 1997; Glomb et al., 1997; Hayase et al., 1997*). Reaktionen mit Disacchariden, insbesondere mit 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden sind in der Literatur kaum beschrieben. *Schuster et al. (2000)* gelang es, in Modellansätzen von Acetyl- bzw. Hippurylarginin mit Lactose ein neues Argininderivat zu detektieren, welches das Hauptderivatisierungsprodukt des Arginins darstellte. Dieses Argininderivat wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert, identifiziert, seine Struktur und sein Bildungsmechanismus aufgeklärt.

4.1 Isolierung und Strukturaufklärung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) und von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

4.1.1 Isolierung und Strukturaufklärung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

Die Isolierung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) wurde wie in 3.4.1.1 bzw. 3.4.1.2 beschrieben vorgenommen. Die Umsetzung von N- α -Hippuryl-L-arginin erfolgte mit Lactose-Monohydrat in einem molaren Verhältnis von 1:5. Der Syntheseansatz wurde 4 h bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Die Isolierung und Reinigung des Reaktionsproduktes Hip-PIO wurde mittels semi-präparativer RP-HPLC vorgenommen (vgl. 3.3.2.2). Dazu wurde der Syntheseansatz membranfiltriert und direkt zur Fraktionierung mittels semi-präparativer RP-HPLC eingesetzt. Hip-PIO eluiert bei ca. 17 min Retentionszeit. Fraktionen, die Hip-PIO enthielten, wurden vereinigt, auf ein Volumen von ca. 20 bis 30 ml reduziert, auf die chromatographische Reinheit mittels analytischer RP-HPLC geprüft und nochmals im zweiten Schritt mittels semi-präparativer RP-HPLC entsalzt. Das so gewonnene Präparat wird nach der Gefriertrocknung den Reinheits- und Identitätsprüfungen unterzogen. Ausgehend von 335 mg Hip-Arg wurden 120 mg Hip-PIO gewonnen, was einer Ausbeute von ca. 36 % entspricht. In Abb. 4.2-1 sind die RP-HPLC Chromatogramme des Gesamtsyntheseansatzes (A) und des Hip-PIO Isolates (B) dargestellt. In Abb. 4.1.1-1 C ist ein Ausschnitt aus dem

4 Ergebnisse und Diskussion

Massenspektrum des Syntheseansatzes mit zu Hip-Arg und Hip-PIO zugehörigen Massen m/z von 336,32 bzw. 434,17 gemessen im positiven Modus als $[MH]^+$ dargestellt. Ergebnisse der Elementaranalyse des isolierten Syntheseproduktes, Hip-PIO sind Kapitel 3.4.1.1 zu entnehmen. Die Reinheit des Isolates bezogen auf den Stickstoffgehalt betrug 90 %. Einen weiteren Nachweis der Struktur lieferte die LC-MS-Messung, wo die für Hip-PIO zu erwartende Massezahl m/z gemessen als $[MH]^+$ von 434,17 sowohl im Gesamtsyntheseansatz als auch im Isolat bestätigt wurde. Eindeutige Strukturaufklärung erfolgte anschließend mittels 1D- und 2D-NMR spektroskopischer Untersuchung.

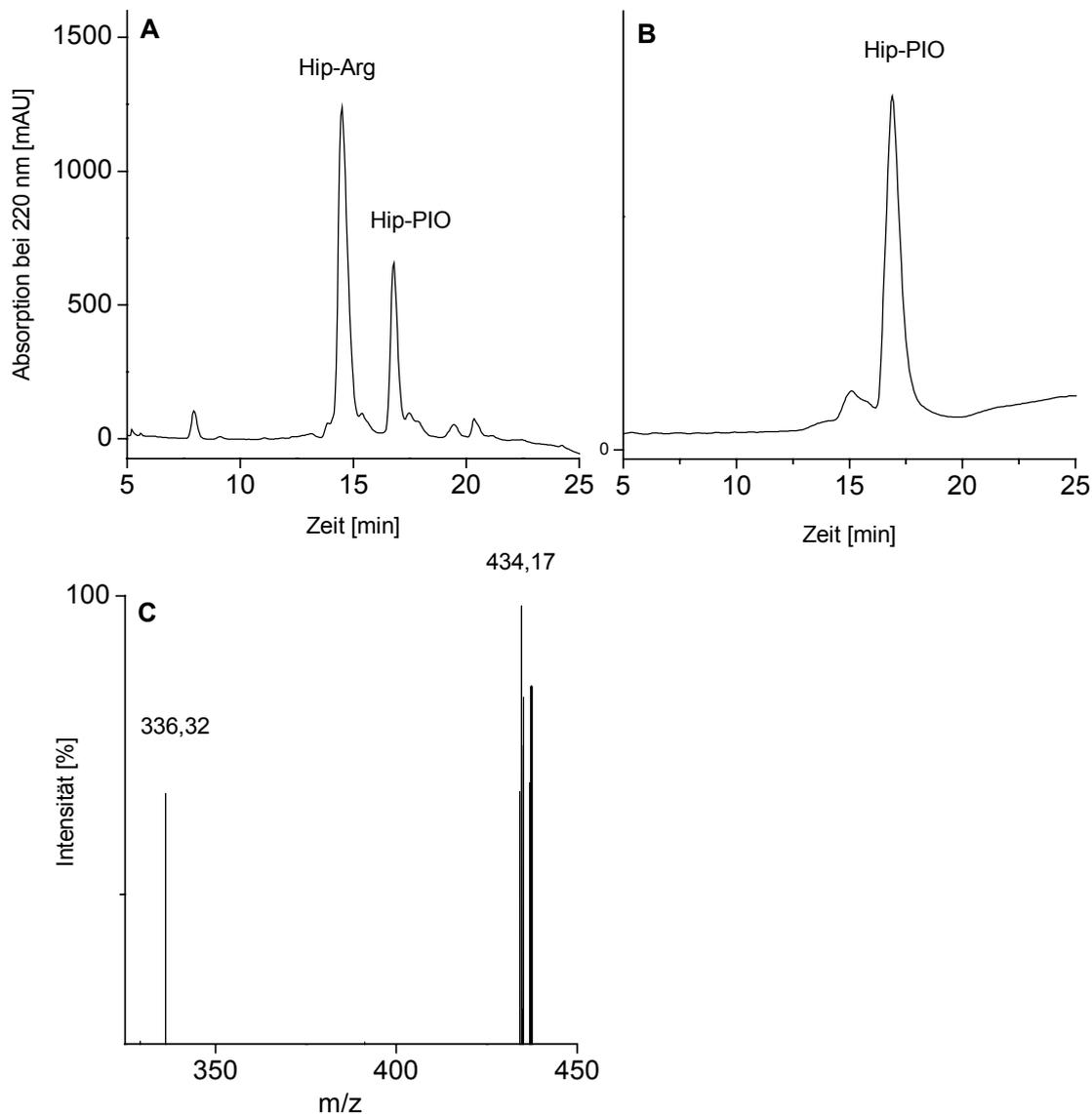


Abbildung 4.1.1-1: RP-HPLC Chromatogramm gemessen im UV bei 220 nm von: **A** Syntheseansatz Hip-Arg und Lactose (1:5) 4 h, 100 °C; **B** Hip-PIO nach der Isolierung mittels semi-präparativer RP-HPLC; **C** Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Gesamtsyntheseansatzes gemessen mittels LC-MS mit den entsprechenden Massezahlen m/z gemessen für Hip-Arg als $[MH]^+$ 336,32 und für Hip-PIO als $[MH]^+$ 434,17

NMR Untersuchungen wurden in DMSO-d₆ und D₂O als Lösungsmittel vorgenommen. Die ¹H- und ¹³C-NMR Spektren des Isolates von Hip-PIO sind in Abb. 4.1.1-2 dargestellt. Verschiebungen einzelner C- bzw. H-Atome sind Kapitel 3.4.1.1 zu entnehmen. Im hinteren Bereich des ¹H-Spektrums zwischen 7 und 8 ppm sind Verschiebungen der zum aromatischen Ring der Benzoesäure zugehörigen H-Atome zu sehen. Im vorderen Bereich, bis 2 ppm, sind die CH₂-Gruppen des Arginins und der Hydroxypropylkette zu sehen.

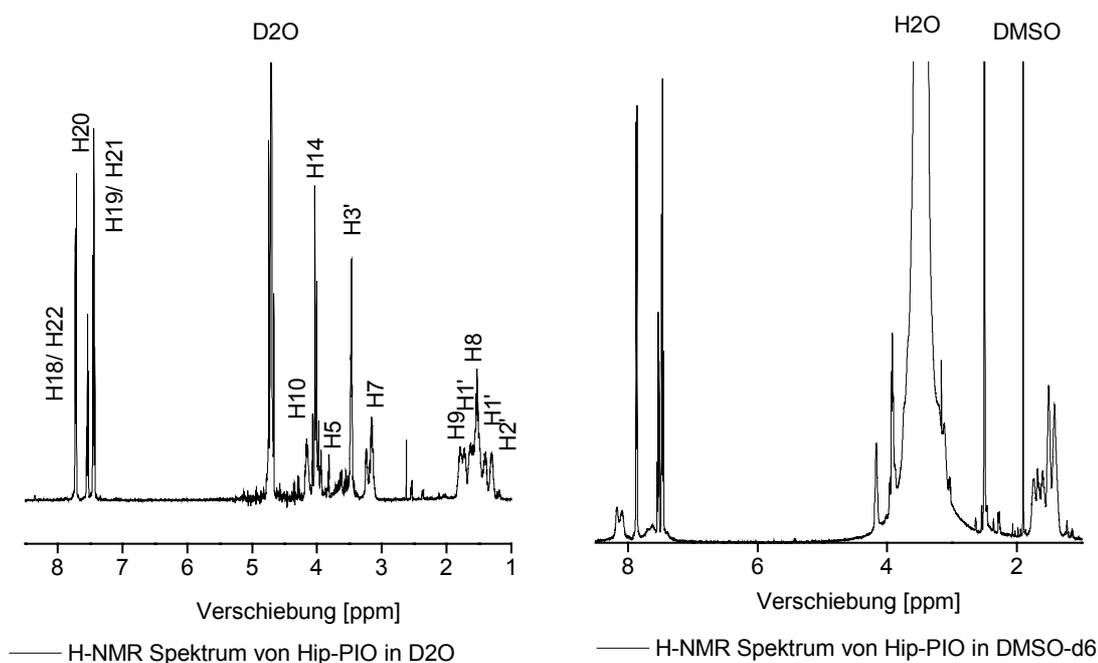


Abbildung 4.1.1-2: ¹H-NMR Spektren von Hip-PIO in D₂O (links) und DMSO-d₆ (rechts)

Das ¹³C-NMR Spektrum des Isolates ist in Abb. 4.1.1-3 dargestellt. Aus dem ¹³C-Spektrum ist die Substitution der C-Atome ersichtlich. Somit können durch Kombination von HSQC und 1D-Spektren CH- und CH₂-Gruppen den einzelnen Verschiebungen zugeordnet werden. Im vorderen Bereich bis 60 ppm sind die CH₂-Gruppen der Hydroxypropylkette sowie des Arginins zu sehen. Bei 54,45 ppm ist das tertiär substituierte C10-Atom identifizierbar. Zwischen 120 und 140 ppm sind die tertiär substituierte C-Atome des Benzolringes, sowie im höheren Feld, bis 200 ppm die quartär substituierten C-Atome zu sehen. Aus dem ¹³C-NMR Spektrum folgt, dass C1' und C2' sekundär substituierte C-Atome sind, die eine Verschiebung von 26,81 ppm für C1' und 25,93 ppm für C2' aufweisen. Folglich ist C2' kein tertiär substituiertes C-Atom, wie ursprünglich erwartet. Es wurde davon ausgegangen, dass 3-Desoxypentosulose mit Arginin zur Verbindung 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(2,3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Abb. 2.3.2-1, **51**) reagiert. Aus dem ¹³C-NMR-Spektrum ist es aber ersichtlich, dass am Atom C2' keine OH-Gruppe vorhanden

ist. Bei Vorhandensein von einer OH-Gruppe am C2' Atom muss das C-Atom eine Verschiebung zum höheren Feld aufweisen, so wie das *Sopio & Lederer (1995)* nach der Umsetzung von Kreatinin mit 3-Desoxypentosulose beschreiben. Sie konnten eine Verschiebung im ^{13}C -Spektrum von 71 ppm dem sekundär substituierten C2' Atom zuordnen (*Sopio & Lederer, 1995*).

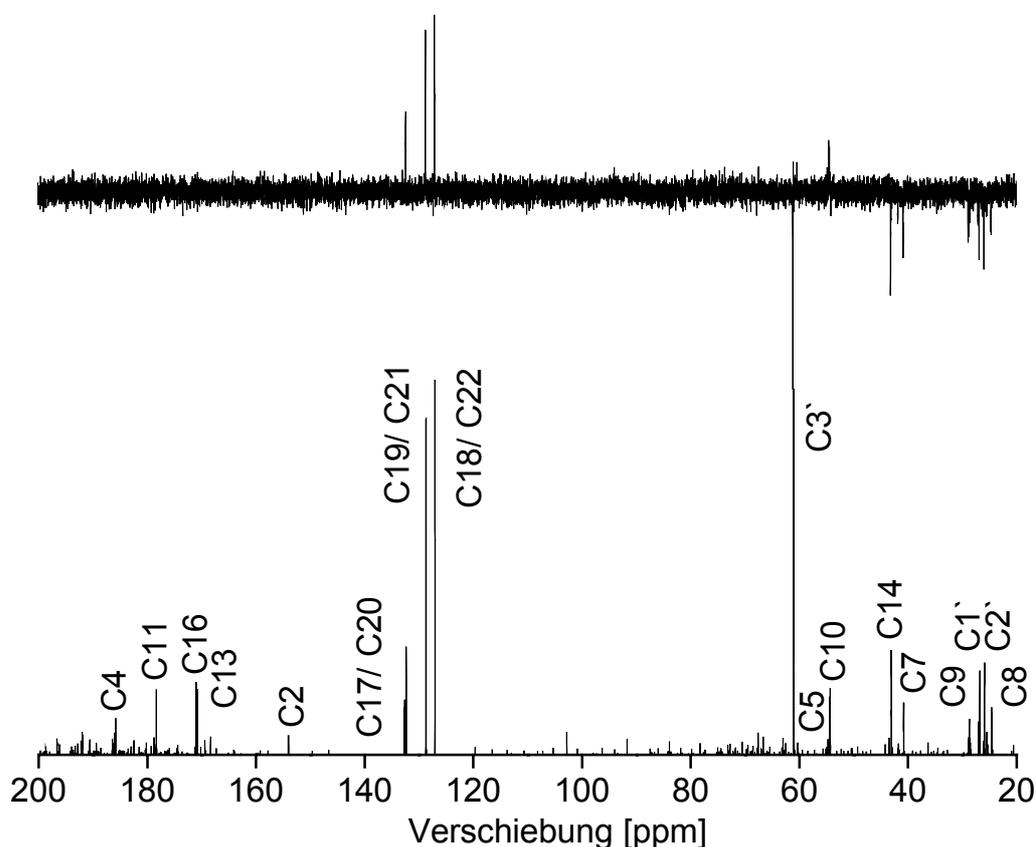


Abbildung 4.1.1-3: ^{13}C -NMR Spektrum von Hip-PIO in D_2O

Sie erhielten ein Imidazolone (siehe 2.3.2), welches eine analoge Struktur zum PIO aufweist, aber eine 2,3-Dihydroxypropylkette am Ring enthält. Eine 2,3-Dihydroxypropylkette konnte bei der NMR spektroskopischen Untersuchung von Hip-PIO nicht nachgewiesen werden. Eindeutig zugeordnet werden konnte auch die Carbonylgruppe am Imidazolinonring am C4, welche bei 188,85 ppm zu finden war. Das tertiär substituierte C5-Atom weist die Verschiebung von 60,01 ppm auf. Die Auswertung der 1D- und 2D-NMR Spektren lieferte die in Abb. 4.1.1-4 (**61**) dargestellte Verbindung.

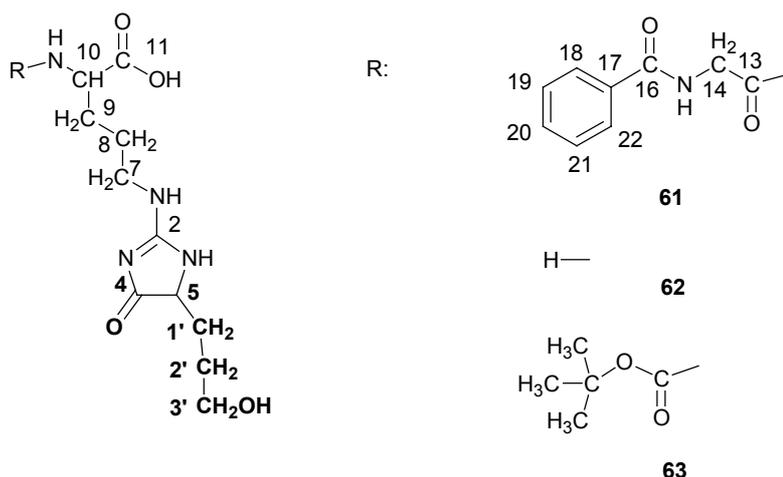


Abbildung 4.1.1-4: Struktur von 2-(2-Benzylamino-acetyl-amino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO, **61**); N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO, **62**); t-Butoxycarbonylamino-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Boc-PIO, **63**)

4.1.2 Isolierung und Strukturaufklärung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

PIO als freie Aminosäure (Abb. 4.1.1-1, **62**) wurde über das Zwischenprodukt t-Butoxycarbonylamino-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Boc-PIO) (Abb. 4.1.1-4, **63**) ausgehend von N-tert-Butoxycarbonylamino-L-arginin (Boc-Arg) gewonnen (vgl. 3.4.1.2). Dies erfolgte analog zur Synthese des hippurylgebundenen PIO, jedoch fand die Reaktion unter wasserfreien Bedingungen nach der Gefriertrocknung des Syntheseansatzes statt. Es zeigte sich, dass die Umsetzung genauso gut und mit vergleichbarer Ausbeute wie im wässrigen System abläuft. Aus dem Reaktionsgemisch wurde die Isolierung und Reinigung von Boc-PIO mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und semi-präparativer RP-HPLC vorgenommen (siehe 3.4.1.2). Jede Fraktion der Säulenchromatographie wurde mittels RP-HPLC mit der UV-Detektion vermessen. In Abb. 4.1.2-1 A ist das RP-HPLC Chromatogramm des methanolischen Boc-PIO Extraktes aus dem Gesamtsyntheseansatz dargestellt. Zu sehen sind mehrere Signale bei 220 nm. Da es sich hierbei um eine neue Synthesemöglichkeit von PIO handelt, erfolgte die Zuordnung des zu Boc-PIO zugehörigen Signals mittels LC-MS Messung, mit der es möglich war die bei 19,9 min Retentionszeit eluierende Verbindung als Boc-PIO zu identifizieren. In Abb. 4.1.2-1 B ist das Chromatogramm von Boc-PIO nach der semi-präparativen RP-HPLC dargestellt. Es ist eindeutig zu sehen, dass im Isolat nur eine bei 220 nm zu identifizierende Verbindung, nämlich Boc-PIO vorhanden ist. Es erfolgte eine weitere Bestätigung der Molmasse von Boc-

PIO mittels LC-MS Messung. Es konnte die zu erwartende Masse gemessen als $[MH]^+$ von m/z 373,4 bestätigt werden (Abb. 4.1.2-1, C). Die nach der semi-präparativen RP-HPLC erhaltenen Boc-PIO-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, entsalzt (vgl. 3.3.2.2) und anschließend lyophilisiert. Um den Reinheitsgrad zu prüfen, wurde das Präparat einer Elementaranalyse unterzogen. Die Elementaranalyse ergab eine Reinheit von 85 % bezogen auf den Stickstoffgehalt.

Um PIO aus Boc-PIO zu gewinnen, musste der Boc-Rest hydrolysiert werden, was im schwach Sauren unter milden Bedingungen möglich war. Hydrolysebedingungen wurden durch Variation der Parameter Säurekonzentration/ Zeit/ Temperatur optimiert, so dass sie mittels 10 %-iger Essigsäure bei 70 °C unter Rückfluß 4 h lang durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen wird PIO selbst nur minimal abgebaut. Dies wurde mittels ASA bei den Detektionswellenlängen von 440 und 570 nm (vgl. 3.3.4) geprüft. Nach der essigsäuren Hydrolyse der Boc-Gruppe wurde das Reaktionsgemisch am Rotationsverdampfer durch mehrmalige Zugabe von je 200 ml Reinstwasser weitgehend von Säure befreit. Anschließend wurde das Präparat gefriergetrocknet und einer Strukturaufklärung unterzogen. Es konnten 60 mg PIO gewonnen werden, was einer Ausbeute von ca. 21 % entspricht. Da die Synthese von PIO über mehrere Schritte und über die Gewinnung des Zwischenproduktes Boc-PIO erfolgt, war eine geringere Ausbeute von PIO im Vergleich zu Hip-PIO auch zu erwarten. Die ESI-TOF-MS Messung lieferte die zu erwartende Massezahl m/z von 273,4 gemessen als $[MH]^+$ (Abb.4.1.2-1, F). Die Reinheit von PIO laut Elementaranalyse betrug 75 % bezogen auf den Stickstoffgehalt. Das Chromatogramm der Aminosäureanalyse von PIO ist in Abb. 4.1.2-1, E zu sehen. Verglichen mit dem Aminosäurestandard (Abb. 4.1.2-1, D) ist zu sehen, dass PIO im basischen Bereich des Aminosäurechromatogramms zwischen Phenylalanin und Histidin mit einer Retentionszeit von 45,9 min eluiert. Die Struktur von freiem PIO wurde ebenfalls mittels 1- und 2D-NMR spektroskopischer Untersuchung bestätigt. Auch hier war aus der Auswertung von NMR Spektren ersichtlich, dass am Imidazolinonring eine 3'-Hydroxypropylkette vorhanden ist, und dass es sich bei C2'-Atom um ein sekundär substituiertes C-Atom handelte, welches die Verschiebung von 29,94 ppm aufwies. Die Carbonylgruppe am C4 wurde mit 176,15 ppm Verschiebung nachgewiesen. Das C5-Atom am Imidazolonring wies eine Verschiebung von 59,39 ppm auf. Die einzelnen Verschiebungen im 1H - bzw. ^{13}C -Spektrum sind Kapitel 3.4.1.2 zu entnehmen. Somit konnte für PIO die in Abb. 4.1.1-4 dargestellte Struktur (**62**) ermittelt werden.

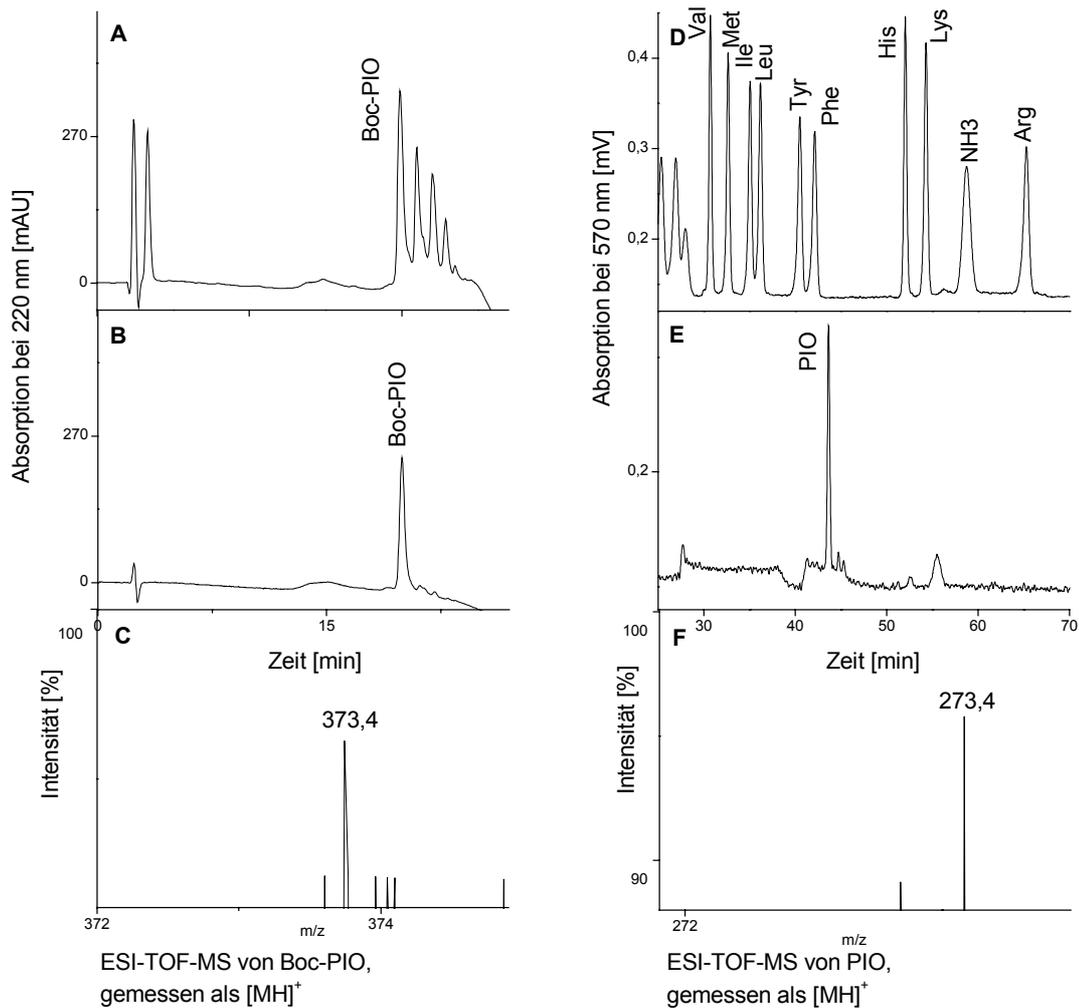


Abbildung 4.1.2-1: RP-HPLC Chromatogramme mit UV-Detektion bei 220 nm (links): **A** Inkubationsansatz Boc-Arg und Lactose (1:5) nach der methanolischen Extraktion, **B** Boc-PIO nach der Säulenchromatographie an Kieselgel und der semi-präparativen RP-HPLC, **C** ESI-TOF-MS von Boc-PIO gemessen als $[MH]^+$; Ionenaustauscherchromatographie mit der Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm (rechts): **D** Aminosäurenstandardgemisch (je 5 nmol/ l); **E** PIO nach der essigsauren Hydrolyse der Boc-Gruppe, **F** ESI-TOF-MS von PIO gemessen als $[MH]^+$

Anhand der hier beschriebenen Untersuchungen und Strukturaufklärungen wurde eindeutig bestätigt, dass es sich bei PIO um eine neue, bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindung handelt, die wahrscheinlich über einen bislang unbekanntem Bildungsweg entsteht. Vergleicht man PIO mit den aus der Literatur bekannten Arginin/ Kohlenhydrat Umsetzungsprodukten (vgl. 2.3.2), wird deutlich, dass bei PIO eine C5-Carbonylverbindung an der Struktur des Imidazolinonringes direkt beteiligt ist. Es stellt sich hier die Frage, wie sich die Bildung dieser Vorstufe aus dem Kohlenhydratabbau erklären lässt.

4.2 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

4.2.1 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit Kohlenhydraten

Aufgrund der UV-Aktivität des Hippurylrestes wurden Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von PIO an Modellansätzen mit N- α -Hippuryl-arginin vorgenommen. Hierzu wurde eine 1 mmolare Hip-Arg Lösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit verschiedenen 10 mmolaren Lösungen von Mono- und Disacchariden in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, gemischt und im Trockenschrank bei 100 °C bis zu 8 Stunden umgesetzt (siehe 3.2.2.1). Für die Untersuchungen wurden die Monosaccharide Glucose und Galactose, das 1,6-verknüpfte Disaccharid Raffinose und die 1,4-verknüpften Disaccharide Maltose und Lactose als reduzierende Kohlenhydratkomponenten gewählt. Die Reaktionsgemische wurden mittels RP-HPLC mit UV-Detektion bei 220 nm auf die Bildung von Hip-PIO untersucht. Nach der Erhitzung von Glucose und Galactose sowie von Raffinose mit Hip-Arg konnte keine Bildung von Hip-PIO beobachtet werden. Eine eindeutige Bildung von Hip-PIO, die im direkten Zusammenhang mit der Inkubationszeit zu messen war, war nur nach Reaktion von Hip-Arg mit Lactose oder Maltose erkennbar. Es wurde damit eindeutig bestätigt, dass PIO bzw. Hip-PIO ein spezifisches, aus der Umsetzung von Arginin bzw. Hip-Arg mit 1,4-verknüpften Disacchariden stammendes Reaktionsprodukt darstellt.

Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Bildungsmechanismus von Hip-PIO beschränkten sich daher auf die Reaktion zwischen Hip-Arg und den 1,4-verknüpften Disacchariden Lactose und Maltose, sowie auf die aus dem Lactose- bzw. Maltoseabbau stammenden 1,2-Dicarbonylverbindungen. Da Hip-PIO über einen bisher nicht bekannten Bildungsweg entsteht, ist es zu erwarten, dass sein Precursor als spezifisches Abbauprodukt gezielt aus 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden gebildet wird. Über die Bildung von C5-Dicarbonylverbindungen aus Kohlenhydraten ist bisher in der Literatur wenig bekannt. Bislang sind nur zwei aus dem Lactose- bzw. Maltoseabbau stammenden α -Carbonylverbindungen beschrieben worden, nämlich 3-Desoxypentulose (3-DP) (Abb. 2.2.2.1-1, **37**) und 3-Desoxypentosulose (3-DPs) (Abb. 2.2.2.2-1, **40**).

4.2.1.1 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit 3-Desoxypentulose

3-Desoxypentulose (3-DP) (vgl. 2.2.2.1, **37**) wurde als ein aus dem Lactoseabbau stammender Minorzucker in sterilisierter Milch nachgewiesen und quantifiziert (*Troyano et al., 1994*). Mit der Erhitzungsdauer und Temperatur nimmt der Gehalt an 3-Desoxypentulose immer weiter

zu, so dass diese Verbindung als Erhitzungsmarker für Milch und Milchprodukte herangezogen werden kann. Da es sich bei 3-Desoxypentulose um eine aus dem Lactoseabbau stammende C5-Carbonylverbindung handelt, und ihre Folgereaktionen bisher in der Literatur nicht beschrieben sind, könnte 3-Desoxypentulose für die Bildung von PIO von Bedeutung sein. Um zu prüfen, ob 3-Desoxypentulose mit Hip-Arg zu Hip-PIO reagiert, wurde die Synthese von 3-Desoxypentulose nach 3.4.2.1 vorgenommen. Es wurden 26 mg der 3-DP aus 20 g Lactose gewonnen, was auch den Literaturangaben (*Troyano et al., 1992*) entspricht. Die Reinheit der synthetisierten 3-DP wurde aufgrund der geringen Ausbeute nur chromatographisch bestimmt und betrug 90 % bezogen auf die Summe der Flächen aller im Chromatogramm vorhandenen Signale gemessen mittels GC-MS im SCAN Modus nach der Derivatisierung zu Trimethylsilylderivaten (TMS). Die für 3-DP-tri- und 3-DP-di-TMS Derivate erwarteten Massezahlen m/z 73, 103, 129, 147, 205, 247 konnten den beiden Isomeren zugeordnet werden. In Abb. 4.2.1.1-1, **A** ist das Chromatogramm der Lösung an 3-Desoxypentulose mit einer Konzentration von 500 ng/ μ l dargestellt. Die Furanose-Form der 3-Desoxypentulose wurde mit 3-DP₁ und die offenkettige Form mit 3-DP₂ bezeichnet. Die offenkettige Form der 3-Desoxypentulose zeigt in Chromatogrammen ein Signal höherer Intensität als die Furanose-Form. Für die Quantifizierung von 3-Desoxypentulose in der Standardlösung und in Milchproben (vgl. 4.5.1) wurde der interne Standard α -D-Galactopyranose verwendet. Im Chromatogramm **A** (Abb. 4.2.1.1-1) ist der interne Standard bei ca. 13 min Retentionszeit zu sehen. In Abb. 4.2.1.1-1, **B** sind die Massezahlen m/z für die einzelnen Fragmente des internen Standards dargestellt. In Abb. 4.2.1.1-1, **C** und **D** sind die Massenspektren der beiden isomeren Formen von 3-Desoxypentulose zu sehen. Beide Isomeren zeigen dieselben Massezahlen im Massenspektrum, jedoch weisen die einzelnen Massezahlen unterschiedliche Intensitäten auf, was für die Zuordnung und Quantifizierung von einzelnen Isomeren ausgenutzt wird. Deutliche Unterschiede im Verhältnis einzelner Ionen sind bei Massezahlen 73, 247 und 103 feststellbar. Aus dem Vergleich von Massenspektren **C** und **D** mit den Literaturangaben (*Troyano et al., 1994*) gelang es, die bei 7,8 min eluierende Verbindung als Furanose- und die bei 9,6 min eluierende Verbindung als offenkettige Form der 3-Desoxypentulose zu identifizieren.

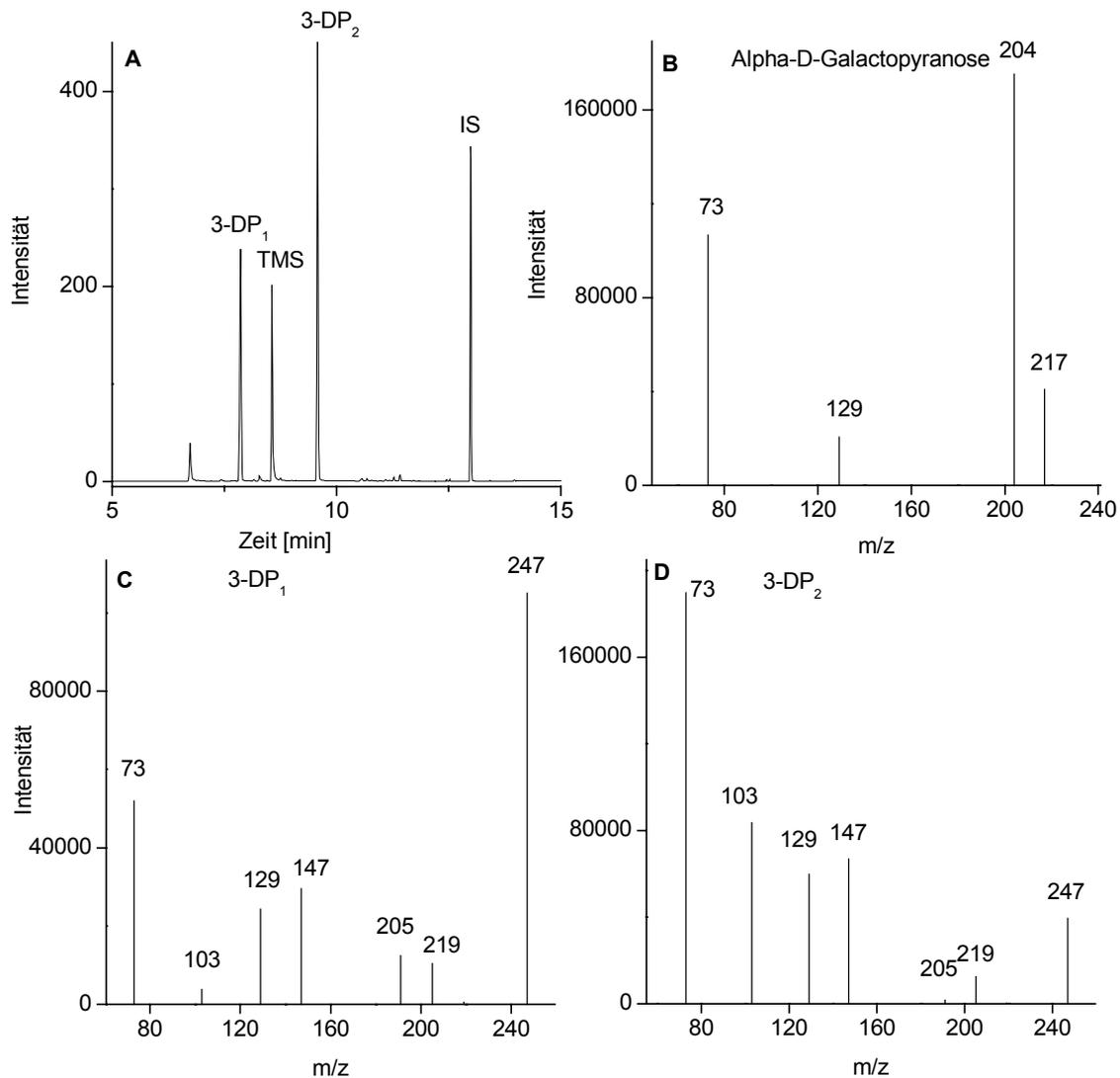


Abbildung 4.2.1.1-1: **A** Gaschromatogramm der Lösung von 3-Desoxyxypentulose (500 ng/ μ l) nach der Silylierung, gemessen mittels GC-MS; **B** Massenspektrum des internen Standards, α -D-Galactopyranose; **C** Massenspektrum der offenkettigen Form der 3-Desoxyxypentulose (3-DP₁) **D** Massenspektrum der Furanose-Form der 3-Desoxyxypentulose (3-DP₂)

In Abbildung 4.2.1.1-2 sind die einzelnen in **C** und **D** (Abb. 4.2.1.1-1) dargestellten Ionenspuren für 3-Desoxyxypentulose in beiden isomeren Formen, Furanose (**A**) und offenkettige Form (**B**) zu sehen. Die GC-MS Software bietet die Möglichkeit, einzelne Ionenspuren aus dem SCAN oder SIM Modus zu extrahieren und in einem "Overlay" darzustellen. Die Übereinstimmung der Maxima einzelner Ionenspuren bei derselben Retentionszeit wird als ein weiterer Parameter für die Quantifizierung unbekannter Verbindungen genutzt. In Abbildung 4.2.1.1-2 ist eindeutig zu sehen, dass die Maxima und Retentionszeiten der Ionenspuren aller fünf Massezahlen für 3-Desoxyxypentulose übereinstimmen.

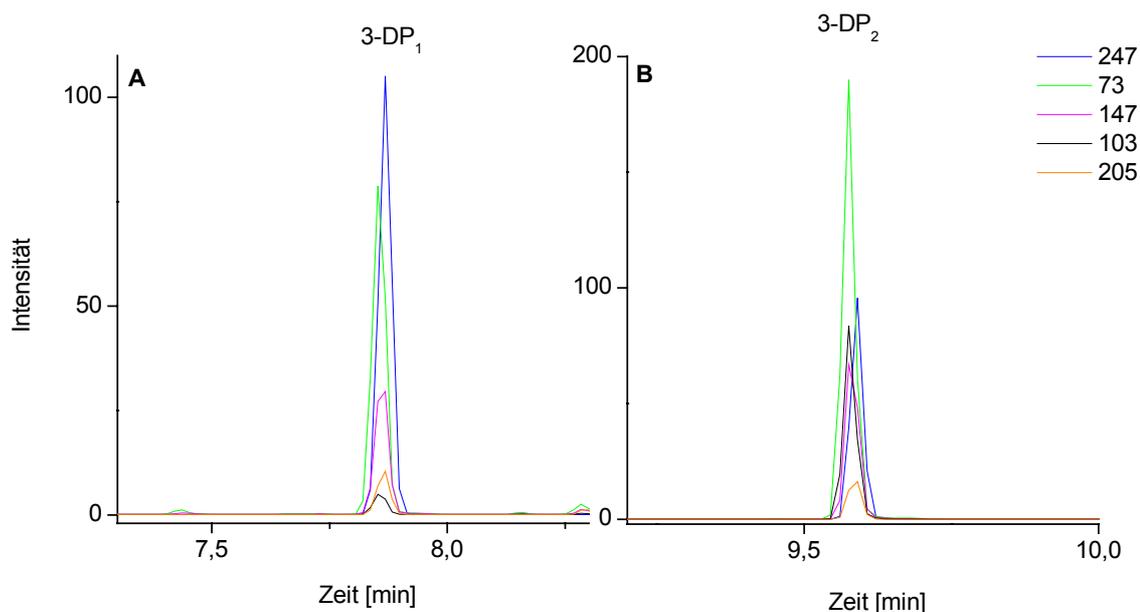


Abbildung 4.2.1.1-2: Overlay einzelner für die 3-Desoxypentulose ermittelter Massezahlen von **A** offenkettiger Form und **B** Furanose-Form

Nachdem die Identität und Reinheit der 3-Desoxypentulose mittels GC-MS bestimmt wurde, wurde sie mit Hip-Arg bei Raumtemperatur und bei 100 °C im Trockenschrank bis zu 2 h lang inkubiert (vgl. 3.5.1.3). Die Umsetzung erfolgte in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0. Die Messung der Bildung von Hip-PIO und des Abbaus von Hip-Arg wurde mittels RP-HPLC mit der UV-Detektion vorgenommen. Bei Raumtemperatur konnte kein Abbau von Hip-Arg, sowie keine Bildung von Hip-PIO verzeichnet werden. Nach 2 h Inkubationszeit bei 100 °C konnte ein Abbau von Hip-Arg von ca. 5 % gemessen werden, was dem Abbau des reinen Hip-Arg in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, entspricht. Hierbei war keine Bildung von Hip-PIO identifizierbar. Um sicher zu stellen, dass die Konzentration an 3-Desoxypentulose für die Derivatisierung der Guanidinogruppe des Arginins ausreicht, wurde sie in mehrfachem Überschuss (molares Verhältnis Hip-Arg zu 3-DP 1:10) eingesetzt. Geht man davon aus, dass ein molares Verhältnis Arginin:Lactose von 1:5 schon ausreichend ist, um eine Bildung von PIO messen zu können, und dass Lactose zu ca. 0,1 % zu 3-Desoxypentulose abgebaut wird (entspricht 6,5 μmol 3-DP aus 5 mmol Lactose), ist es zu erwarten, dass der 10-fache molare Überschuss an reiner 3-Desoxypentulose ausreichend sein muss, um eine Bildung von Hip-PIO nach relativ kurzer Inkubationszeit messen zu können. Auch im Fall des mehrfachen molaren Überschusses an 3-Desoxypentulose zu Hip-Arg konnte keine Bildung von Hip-PIO verzeichnet werden. Somit wurde nachgewiesen, dass es sich bei 3-Desoxypentulose um keinen Precursor von PIO handelt.

4.2.1.2 Abbaumechanismus von 3-Desoxyentulose

Da die Umsetzung von 3-DP mit Hip-Arg zu keinen bei 220 nm identifizierbaren Reaktionsprodukten führt, stellt sich die Frage, inwieweit 3-Desoxyentulose in Abwesenheit von Aminokomponente bei höheren Temperaturen abgebaut wird. Hierzu wurde eine 1 mmolare Lösung von 3-Desoxyentulose in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bei 100 °C im Trockenschrank bis zu 2 h lang erhitzt, mittels o-Phenylendiamin derivatisiert (vgl. 3.2.2.4) und mittels RP-HPLC mit UV-Detektion untersucht (vgl. 3.3.2.3). In Abb. 4.2.1.2-1 **B** ist das Chromatogramm einer nicht erhitzten und einer für 1 h bei 100 °C erhitzten Lösung von 3-Desoxyentulose nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin dargestellt. Der mit X gekennzeichnete Peak (vgl. 3.4.2.2) im Chromatogramm ist ein direktes Reaktionsprodukt der 3-Desoxyentulose, bei dem es sich wahrscheinlich um eine 1,2-Dicarbonylverbindung handelt. Um dieses zu beweisen, wurde eine Messung mittels RP-HPLC mit Dioden Array Detektion vorgenommen. Als Vergleich wurde die in Abb. 4.2.1.2-1 **A** dargestellte Stammlösung bestehend aus 3-Desoxyglucosulose, Glyoxal und Methylglyoxal gemessen. Sowohl Verbindung X als auch alle drei Standardsubstanzen wiesen identische, für Chinoxaline charakteristische Absorptionsmaxima auf.

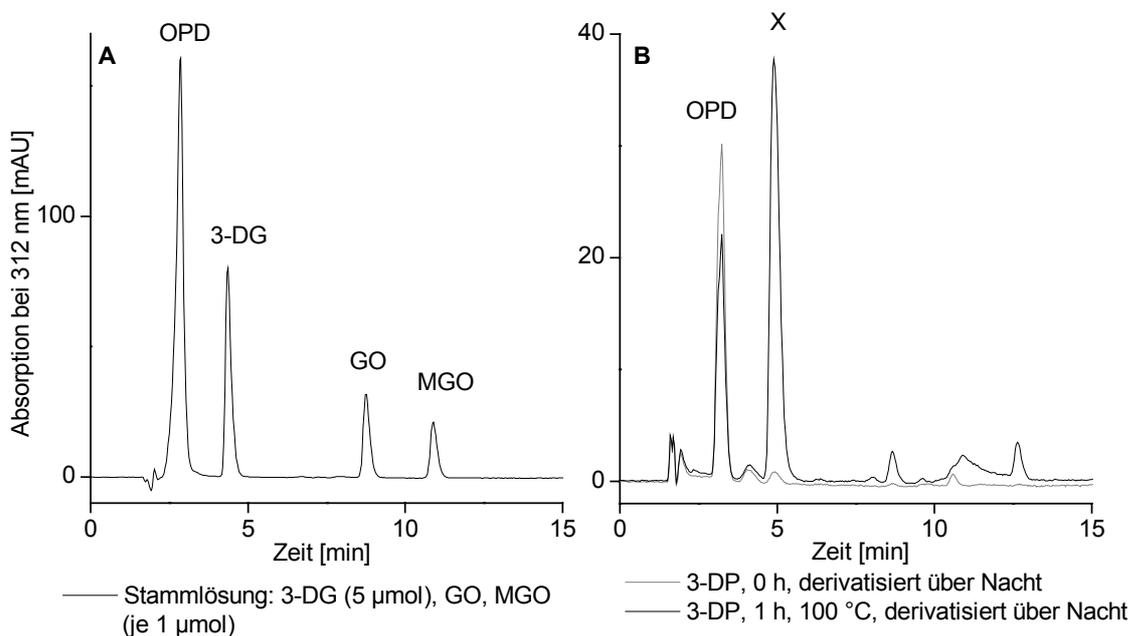


Abbildung 4.2.1.2-1: RP-HPLC Chromatogramm mit UV-Detektion bei 312 nm von **A** Stammlösung bestehend aus 3-DG (5 µmol), GO, MGO (je 1 µmol) und **B** 3-DP, 0 h bzw. 1 h Inkubation bei 100 °C, dann die Umsetzung mit OPD

Vergleicht man beide Chromatogramme, so kann man feststellen, dass es sich bei der Verbindung X um eine neue in der Stammlösung nicht vorhandene, nach 3-

Desoxyglucosulose im Chromatogramm bei 5 min Retentionszeit eluierende Verbindung handelt. Verbindung X wurde gleichzeitig in Lactose Inkubationsansätzen als eines ihrer Abbauprodukte identifiziert (vgl. 3.2.2.4). Nach einer LC-MS-Messung des Inkubationsansatzes von 3-DP nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin konnte für X eine Massezahl m/z gemessen als $[MH]^+$ von 205,2 gemessen werden. Vergleicht man die für X gemessene Massezahl mit den in der Literatur veröffentlichten Massen für Chinoxalinverbindungen (*Nedvidek et al., 1992*), kann man davon ausgehen, dass es sich bei Chinoxalin X um 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (Abb. 4.2.1.2-2, **64**), das Chinoxalin der 3-Desoxypentosulose (**40**) (vgl. 2.2.2.2) handelt.

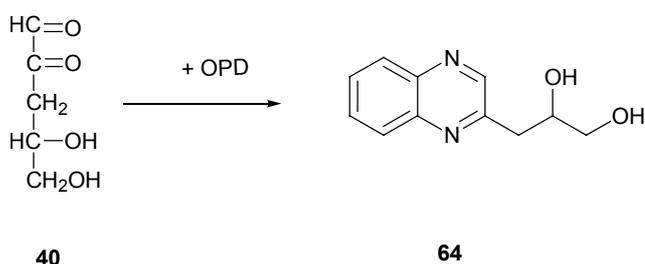


Abbildung 4.2.1.2-2: Strukturformel des aus dem Lactoseabbau stammenden Derivates 3-Desoxypentosulose (3-DPs): 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**64**); 3-Desoxypentosulose (**40**)

4.2.1.3 Synthese und Strukturaufklärung von 3-Desoxypentosulose

3-Desoxypentosulose (3-DPs) ist eine 1,2-Dicarbonylverbindung, die aus 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden gebildet wird (vgl. 2.2.2.2). Um die Vermutung bestätigen zu können, dass aus 3-Desoxypentulose während der Erhitzung 3-Desoxypentosulose gebildet wird, wurde 3-Desoxypentosulose wie in 3.4.2.3 beschrieben synthetisiert. Die Synthese wurde ausgehend von Arabinose vorgenommen (*Hollnagel, 2000*), indem Arabinose erst zu einem 3-DPs-Benzoylbishydraron umgewandelt wurde, welches dann nach dem Umhydrazonierungsschritt mit Benzaldehyd abgespalten wurde und die 3-DPs aus dem Reaktionsgemisch abdestilliert wurde. So erhielt man eine zähe gelbe Flüssigkeit. Es erfolgte eine Strukturaufklärung der isolierten Substanz, indem sie mit o-Phenylendiamin umgesetzt und mittels RP-HPLC sowie LC-MS untersucht wurde. In Abb. 4.2.1.3-1 sind Chromatogramme einer für 2 h bei 100 °C erhitzten 0,18 molaren Lactose Lösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin (**A**) und der synthetisierten 3-Desoxypentosulose nach der Derivatisierung zum entsprechenden Chinoxalin (**B**) dargestellt. Eindeutig zu sehen ist die Übereinstimmung der Retentionszeiten im Chromatogramm der synthetisierten 3-Desoxypentosulose mit der aus dem Lactoseabbau entstehenden Verbindung bei 5 min. Eine weitere aus dem Lactoseabbau stammende

Verbindung, die zu den Hauptabbauprodukten zu gehören scheint, wurde hier mit Y bezeichnet (vgl. 3.4.2.4).

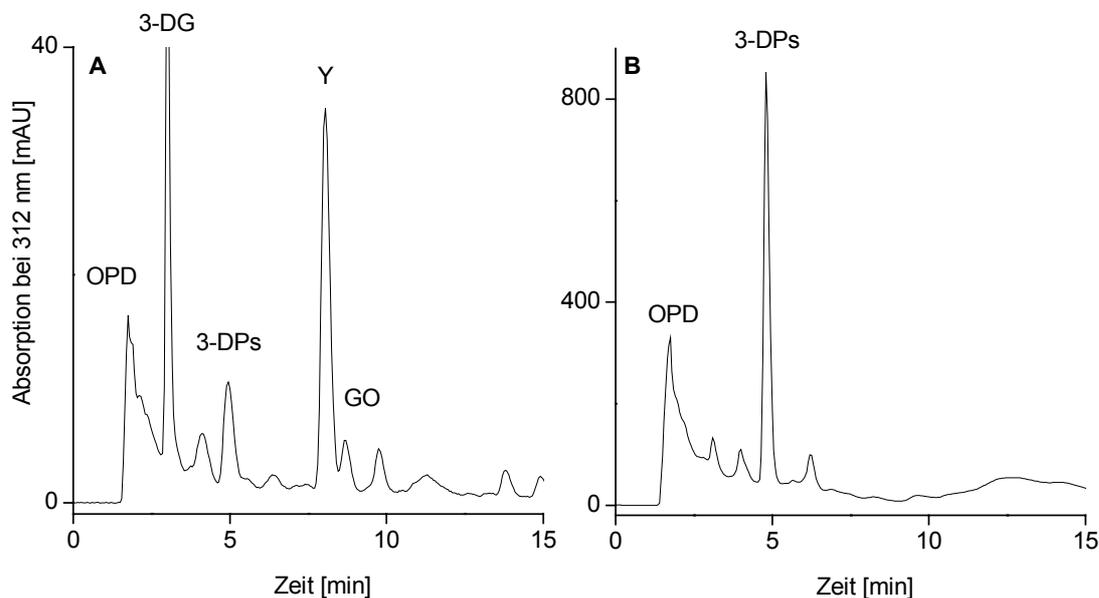


Abbildung 4.2.1.3-1: RP-HPLC Chromatogramm mit UV-Detektion bei 312 nm; **A** 0,18 molare Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 erhitzt bei 100 °C 2 h und dann derivatisiert mit o-Phenylendiamin; **B** Syntheseprodukt 3-Desoxypentose, derivatisiert mit o-Phenylendiamin

Die in Abb. 4.2.1.3-1 **B** dargestellte Probe wurde zur Ermittlung der molaren Masse des Syntheseproduktes einer LC-MS-Messung (vgl. 3.3.5.1) unterzogen. In Abb. 4.2.1.3-2 ist ein Ausschnitt aus dem Chromatogramm des Isolates gemessen mittels LC-MS im TIC (**A**) und die dazugehörige Ionenspur (**B**) dargestellt. Die Massezahl m/z für das Chinoxalin der 3-Desoxypentose gemessen im positiven Modus als $[MH]^+$ betrug 205,2. Es wurden weiterhin die Massezahlen m/z für Natrium- und Kalium-Addukte ($[MNa]^+$ von 228 und $[MK]^+$ von 243) gemessen. Vergleicht man die Ergebnisse der RP-HPLC und der LC-MS-Messung der Umsetzung von 3-Desoxypentose bei 100 °C, der Inkubation der Lactose bei 100 °C und der synthetisierten 3-Desoxypentose nach der Derivatisierung zum Chinoxalin, so ist es ersichtlich, dass es sich bei der Verbindung mit 5 min Retentionszeit im Chromatogramm in allen drei Fällen um das Chinoxalin der 3-Desoxypentose (**64**) handelt.

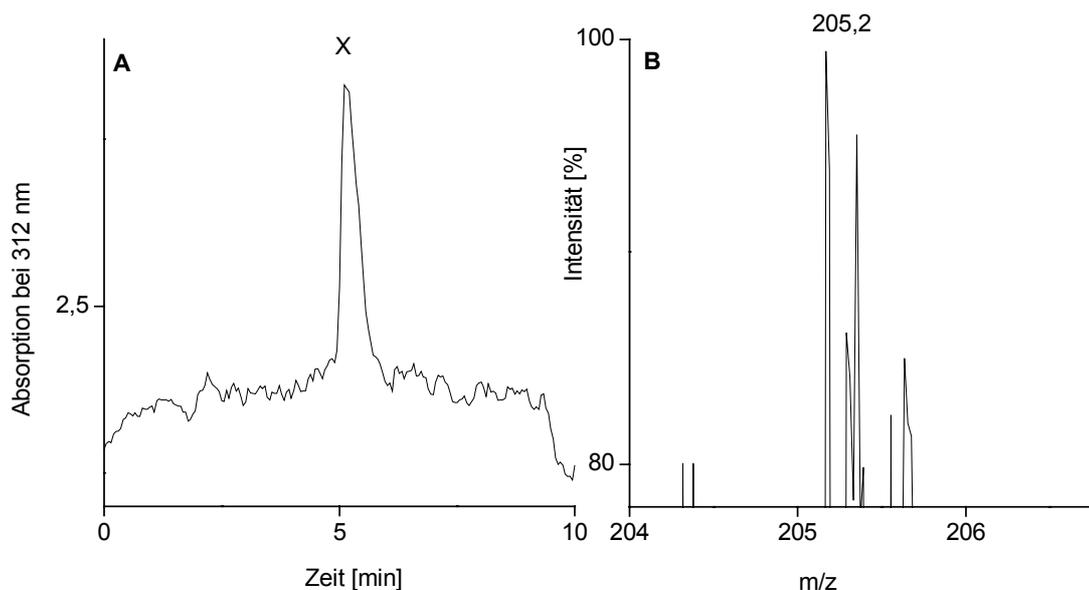
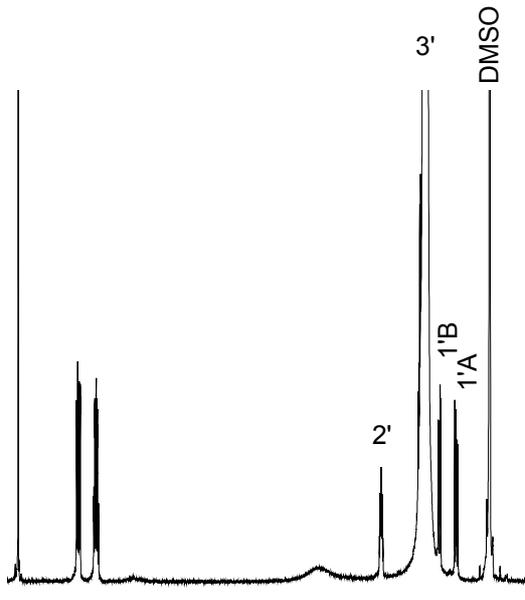


Abbildung 4.2.1.3-2: **A** LC Chromatogramm im TIC gemessen im UV bei 312 nm des isolierten Peaks X aus Lactoseinkubationsansätzen und **B** m/z von Peak X gemessen als $[MH]^+$

Für einen eindeutigen zweifelsfreien Nachweis der 3-Desoxypentosulose in Lactoseinkubationsansätzen wurde die bei 5 min Retentionszeit eluierende Verbindung isoliert. Hierzu wurde eine 0,18 molare Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 0,02 %-igen wässrigen o-Phenylendiaminlösung versetzt und 2 h lang bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert (vgl. 3.4.2.2). Die Hitzebehandlung der Lactoselösung erfolgte in Anwesenheit von o-Phenylendiamin, da es sich aus Voruntersuchungen im analytischen Maßstab herausstellte, dass die Bildung von 3-Desoxypentosulose dadurch katalysiert wird. Die Isolierung des hierbei gebildeten Chinoxalins wurde mittels semi-präparativer RP-HPLC vorgenommen (vgl. 3.3.2.3). Das bei ca. 10 min Retentionszeit an der semi-präparativen RP-HPLC eluierende Chinoxalin wurde aufgefangen und nach der Lyophilisierung der 1D- und 2D-NMR-spektroskopischen Untersuchung unterzogen. Die hierbei erhaltenen 1H - und ^{13}C -NMR Spektren sind in Abbildung 4.2.1.3-3 dargestellt. Die einzelnen Verschiebungen im 1H - und ^{13}C -Spektrum sind Kapitel 3.4.2.2 zu entnehmen. Die ermittelten Werte für die Verschiebungen im ^{13}C - und 1H -Spektrum stimmen mit den von *Nedvidek et al. (1992)* sowie von *Hollnagel und Kroh (2000)* veröffentlichten Werten für 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin überein. Aus dem ^{13}C -NMR Spektrum ist es ersichtlich, dass das C2' Atom ein tertiär substituiertes C-Atom ist, welches die Verschiebung zum höheren Feld aufweist und im ^{13}C -Spektrum bei 73,4 ppm zu finden ist. Die C-Atome 1' und 3' sind CH_2 -Gruppen, die

4 Ergebnisse und Diskussion

Verschiebungen bei 31,34 ppm für C1' und 65,79 ppm für C3' aufweisen, wobei das C-Atom 3' durch das Vorhandensein der OH-Gruppe die Verschiebung zum höheren Feld zeigt.



— H-NMR-Spektrum von 2-(2', 3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin

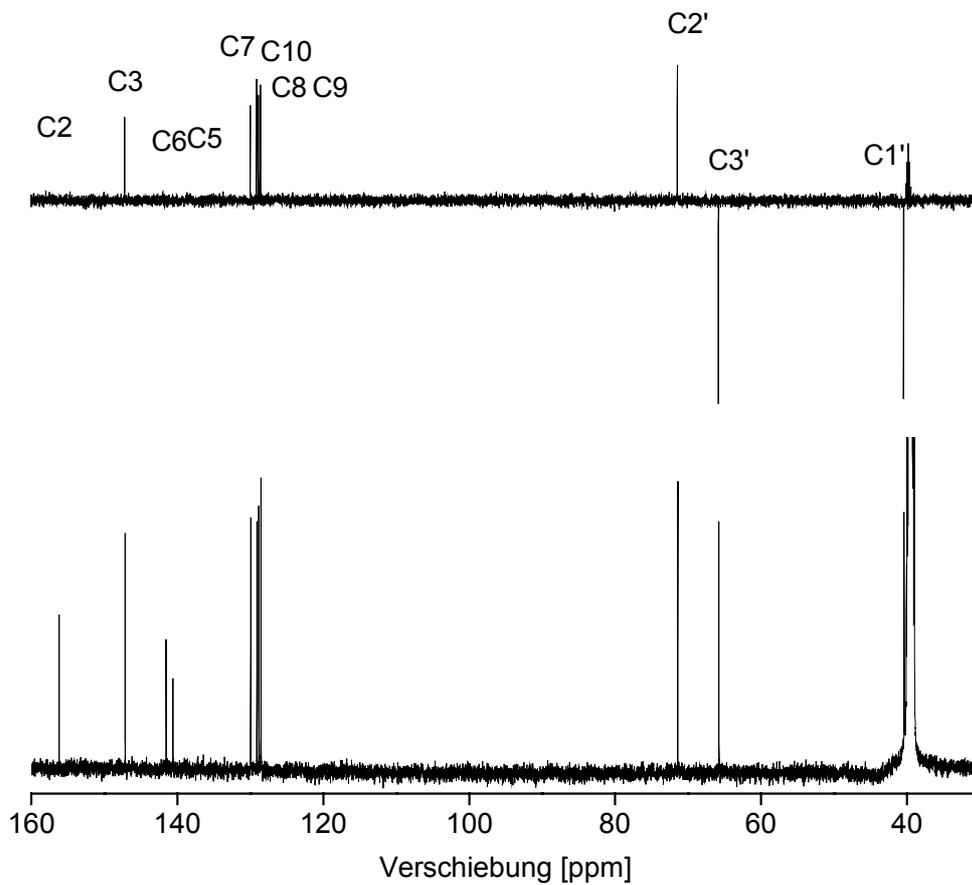


Abbildung 4.2.1.3-3: ^1H - und ^{13}C -NMR Spektren des 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalins

Nach der Strukturaufklärung mittels 1-D und 2D-NMR Spektren konnte zweifelsfrei bestätigt werden, dass es sich bei der aus dem Lactoseinkubationsansatz isolierten Verbindung bei 5 min Retentionszeit im Chromatogramm um das Chinoxalin der 3-DPs, das 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (Abb. 4.2.1.2-2, **64**) handelt. Aus den oben aufgeführten ¹H- und ¹³C-NMR Spektren, sowie aus den HSQC und HMBC Spektren ergibt sich die in Abb. 4.2.1.2-2, **64** dargestellte Struktur.

Die Arbeiten im Arbeitskreis *Kroh (Hollnagel und Kroh, 2000)* ergaben, dass die 3-Desoxypentosulose das Hauptabbauprodukt aus Maltose unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion darstellt (vgl. 2.2.2.2). Obwohl Lactose wie Maltose ein 1,4-glycosidisch verknüpftes Disaccharid ist, und man davon ausgehen kann, dass auch bei Lactose unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion 3-Desoxypentosulose ebenfalls als eins der Hauptabbauprodukte gebildet wird, gibt es dazu bisher in der Literatur nur wenig Information. Die Bildung der 3-DPs bei der Herstellung von Lebensmitteln, sowie ihre Folgereaktionen sind ebenfalls wenig untersucht.

4.2.1.4 Umsetzung von N- α -Hippuryl-arginin mit 3-Desoxypentosulose

Einige Untersuchungen zu Folgereaktionen der 3-Desoxypentosulose sind aus der Literatur bekannt und wurden an Modellansätzen durchgeführt. Die Umsetzung mit N,N-Dimethylguanidin und N-Methylguanidin als Modelle für Kreatin und proteingebundenes Arginin untersuchten *Sopio & Lederer (1995)*. Sie beschrieben zwei daraus resultierende Verbindungen (vgl. 2.3.2, **51**, **52**). Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass Hip-PIO aus der Umsetzung von Hip-Arg mit 3-Desoxypentulose nicht gebildet wird, und dass 3-Desoxypentosulose bei hohen Temperaturen aus 3-Desoxypentulose entsteht, kann man davon ausgehen, dass auch aus der direkten Umsetzung von Hip-Arg mit 3-Desoxypentosulose keine Bildung von Hip-PIO zu verzeichnen sein wird. Es wurde eine Untersuchung zur Reaktion von Hip-Arg und 3-Desoxypentosulose vorgenommen, indem eine 1 mmolare Lösung von Hip-Arg in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit verschiedenen Volumina an 3-Desoxypentosulose versetzt und bis zu 4 h bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert wurde (vgl. 3.5.1.3). Das dabei erhaltene RP-HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 4.2.1.4-1 (**B**) dargestellt. Wie erwartet reagiert die 3-Desoxypentosulose sehr schnell mit der Guanidinogruppe des Arginins, so dass schon nach 2 h Inkubationszeit bei 100 °C fast kein Hip-Arg mehr detektierbar ist. Vergleicht man das Chromatogramm **B** mit dem in Abbildung 4.2.1.4-1 dargestellten Chromatogramm eines Hip-PIO Syntheseansatzes (**A**), so kann man feststellen, dass eine Bildung von Hip-PIO aus 3-Desoxypentosulose nicht erfolgt ist. Es sind mehrere Reaktionsprodukte im Chromatogramm zu sehen, deren Flächen

proportional zur Inkubationszeit zunehmen. Das mit Fragezeichen gekennzeichnete Signal scheint das direkte Umsetzungsprodukt des Hip-Arg zu sein. Nähere Untersuchungen diesbezüglich sind nicht vorgenommen worden.

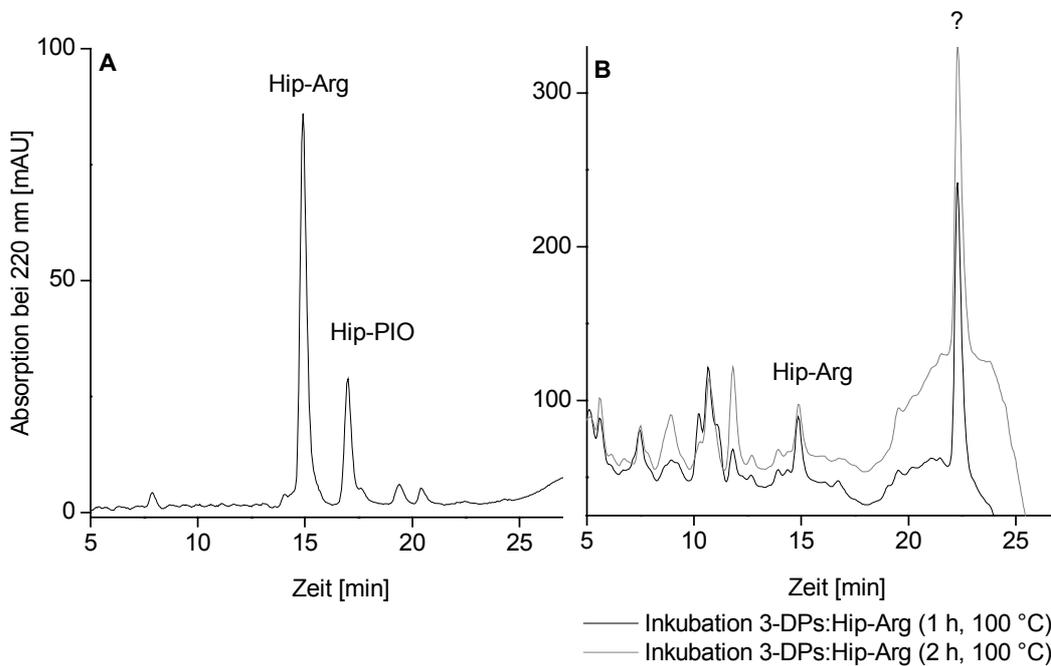


Abbildung 4.2.1.4-1: RP-HPLC Chromatogramm gemessen im UV bei 220 nm von **A** Syntheseansatz von Hip-PIO und **B** Inkubationsansatz aus 3-DPs und Hip-Arg in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 für 1 und 2 h bei 100 °C

4.2.2 Umsetzung von Lactose mit o-Phenylendiamin

Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von PIO ausgehend von den aus dem Lactoseabbau beschriebenen Carbonylverbindungen 3-Desoxypentulose und 3-Desoxypentulosulose als mögliche Precursoren ergaben, dass keine von beiden Verbindungen zur Bildung von Hip-PIO führt, wenn sie mit Hip-Arg inkubiert wird. Folglich bedeutet das, dass weitere aus dem Lactoseabbau stammende 1,2-Dicarbonylverbindungen entstehen, die einen C5-Körper aufweisen und mit Hip-Arg zu Hip-PIO reagieren. Da es sich bei PIO bzw. Hip-PIO um eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Verbindung handelt, kann man davon ausgehen, dass wahrscheinlich auch der Precursor eine neue aus dem Abbau von 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden stammende Verbindung sein muss. Schaut man sich das in Abb. 4.2.1.3-1 A dargestellte Chromatogramm einer 0,18 molaren Lactoselösung nach der Inkubation bei 100 °C für 2 h und anschließender Derivatisierung mit o-Phenylendiamin an, so kann man feststellen, dass eine mit Y gekennzeichnete Verbindung das Hauptderivat der Lactose darstellt. Diese Verbindung konnte keinem der vorhandenen Standards Glyoxal,

Methylglyoxal, 3-Desoxyglucosulose, Glucoson und 3-Desoxypentosulose zugeordnet werden.

4.2.2.1 Inkubation von Lactose mit und ohne N- α -Hippuryl-arginin

Um den Lactoseabbaumechanismus und die daraus resultierenden Verbindungen näher zu untersuchen, wurde die Umsetzung von Lactose in zwei parallel laufenden Inkubationsansätzen untersucht. In einer Probenreihe wurde eine 10 mmolare Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit einer 1 mmolaren Hip-Arg Lösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 im Trockenschrank bei 100 °C bis zu 2 h lang inkubiert (vgl. 3.5.1.1) und auf die Bildung von Hip-PIO mittels RP-HPLC mit der UV-Detektion bei 220 nm untersucht (vgl. 3.3.2.2). Diese Probenansätze wurden ferner nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin auf das Chinoxalinspektrum geprüft (vgl. 3.3.2.3). Diese Untersuchung sollte Aufschlüsse über die Reaktivität der aus Lactose gebildeten 1,2-Dicarbonylverbindungen geben.

In einer zweiten Probenreihe erfolgte die Inkubation von Lactose unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben, jedoch unter Abwesenheit von Aminokomponente. Auch diese Ansätze wurden nach dem Erhitzen mit o-Phenylendiamin derivatisiert und auf Chinoxaline mittels RP-HPLC mit der UV-Detektion bei 312 nm untersucht.

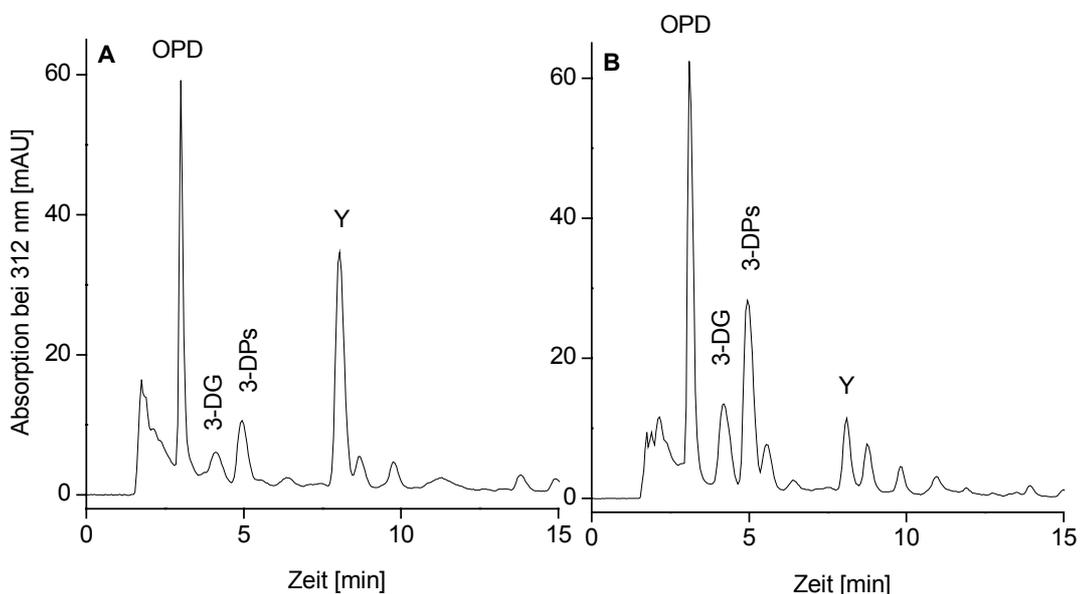


Abbildung 4.2.2.1-1: RP-HPLC Chromatogramm gemessen im UV bei 312 nm von **A** einer Lactose:Hip-Arg (10:1, molares Verhältnis) Lösung, inkubiert bei 100 °C, 2 h, dann derivatisiert mit o-Phenylendiamin und **B** einer 10 mmolaren Lactose Lösung erhitzt 2 h bei 100 °C, dann derivatisiert mit o-Phenylendiamin

In Abbildung 4.2.2.1-1 **A** ist **Y** als Hauptderivat der ohne Aminokomponente erhitzten Lactoselösung zu sehen. Für die Lactoselösung, die in Anwesenheit von Hip-Arg erhitzt worden war, sieht man in **B** deutlich geringere Mengen von **Y**. In diesen Ansätzen konnte gleichzeitig eine Bildung von Hip-PIO verzeichnet werden.

Da die Messung von Chinoxalinen mittels RP-HPLC bei 312 nm erfolgte, wurde zur Identitätsprüfung der Verbindung **Y** eine Messung mittels RP-HPLC mit Dioden Array Detektion vorgenommen, anhand welcher es möglich war, diese Verbindung als ein Chinoxalin zu klassifizieren, da sie dieselben Absorptionsmaxima wie die Standardverbindungen aufwies. Daraufhin erfolgte die Messung der Proben mittels LC-MS im positiven Messmodus mit den in 3.3.5.1 aufgeführten Messparametern. Hierbei konnte eine Massezahl m/z für **Y** gemessen als $[MH]^+$ von 189,11 gemessen werden. Der Ausschnitt aus dem LC-MS Chromatogramm im TIC (**A**) sowie die dazugehörige Massezahl m/z für **Y** (**B**) sind in Abbildung 4.2.2.1-2 dargestellt.

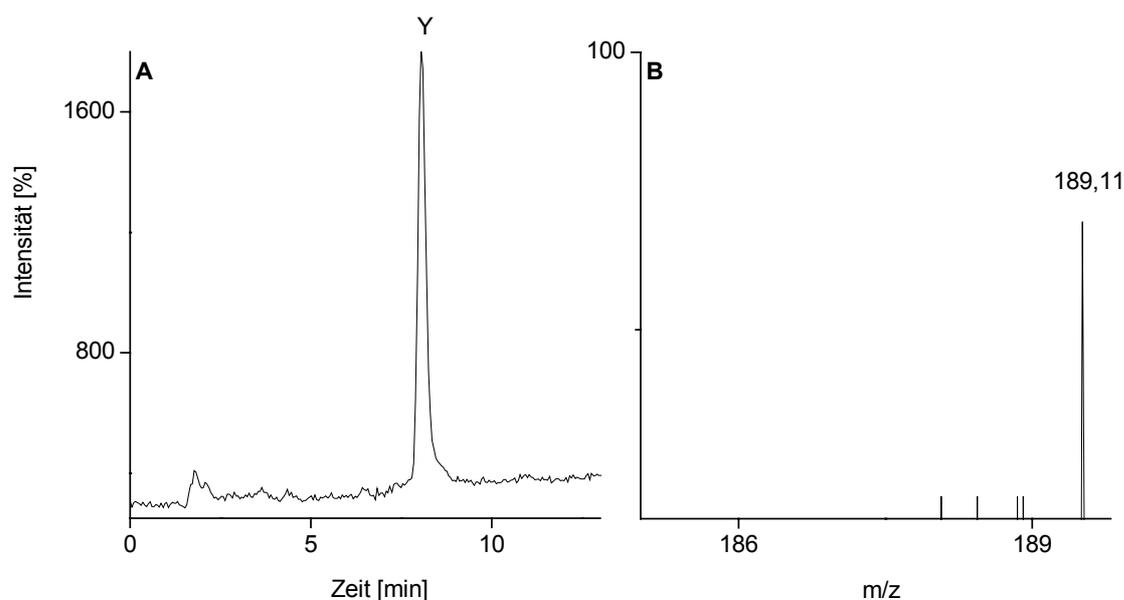


Abbildung 4.2.2.1-2: **A** LC Chromatogramm im TIC der Verbindung **Y** aus Lactoseinkubationsansätzen und **B** m/z von Peak **Y** gemessen als $[MH]^+$

Für die Verbindung **Y** konnten keine vergleichbaren in der Literatur beschriebenen und zu der molaren Masse 188,1 passenden Chinoxaline gefunden werden. Bei dieser 1,2-Dicarbonylverbindung könnte es sich um den Precursor von PIO handeln. In einer weiteren Untersuchung wurde 0,18 molare Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bis zu 3 h lang bei 100 °C erhitzt und auf die Bildung von **Y** nach der Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin untersucht. In Abb. 4.2.2.1-3 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von **Y** in diesen Inkubationsansätzen dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass in Abwesenheit von

Hip-Arg die Fläche des Chinoxalins Y stetig zunimmt. Gibt man zu den erhitzten Lactoselösungen Hip-Arg dazu, und inkubiert man diese Probenansätze erneut für kurze Zeit, so kann man einen relativ schnellen Abbau von Y bei gleichzeitiger Bildung von Hip-PIO verzeichnen.

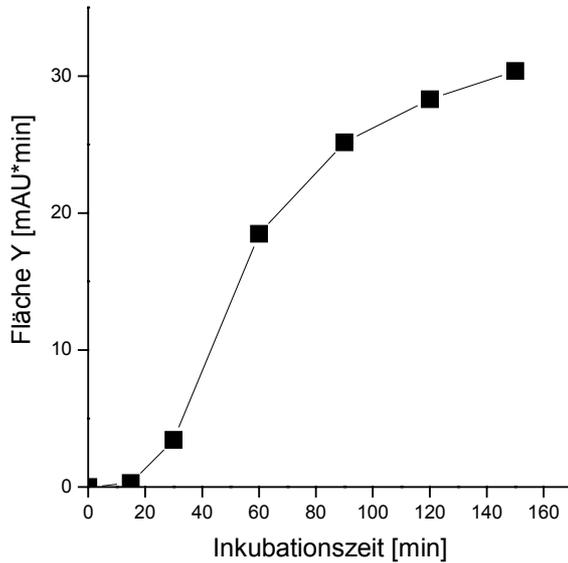


Abbildung 4.2.2.1-3: Bildung von Y beim Erhitzen von Lactose (100 °C) in Abwesenheit von Hip-Arg

In weiteren Untersuchungen erfolgte eine indirekte Bestimmung des PIO Precursors, indem eine 10 mmolare Lactoselösung (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) 2 h lang bei 100 °C hitzebehandelt wurde, dann mit einer 1 mmolaren Lösung an Hip-Arg versetzt und für weitere 2 h erneut bei 100 °C inkubiert wurde (vgl. 3.5.1.1). In Abb. 4.2.2.1-4 sind der Abbau von Hip-Arg und die Bildung von Hip-PIO graphisch dargestellt. In den Lactoselösungen, die vor dem Zusatz von Hip-Arg hitzebehandelt wurden, findet schon nach 15 min Inkubation eine Bildung von Hip-PIO statt (Abb. 4.2.2.1-4, **A**). Dagegen ist in Lactoseansätzen, die ohne Vorbehandlung direkt mit Hip-Arg inkubiert wurden, die Bildung von Hip-PIO auch nach 30 min Inkubationszeit nicht messbar (Abb. 4.2.2.1-4, **B**). Gleichzeitig kann man feststellen, dass ein Abbau von Hip-Arg in den Inkubationsansätzen mit der hitzebehandelten Lactoselösung schneller abläuft als in den unbehandelten Ansätzen. Vergleicht man jedoch die Bildungsrate von Hip-PIO in beiden Inkubationsansätzen nach 2 h Inkubationsansatz, so sieht man, dass diese vergleichbar sind. Es deutet sich an, dass beim Erhitzen von Lactose stabile Abbauprodukte entstehen, die bei der Anwesenheit von einer Aminokomponente (Hip-Arg) sehr schnell weiter reagieren. Diese Beobachtung konnte auch in Voruntersuchungen zum Lactoseabbau gemacht werden, und ist deutlich in Abb. 4.2.2.1-1 dargestellt.

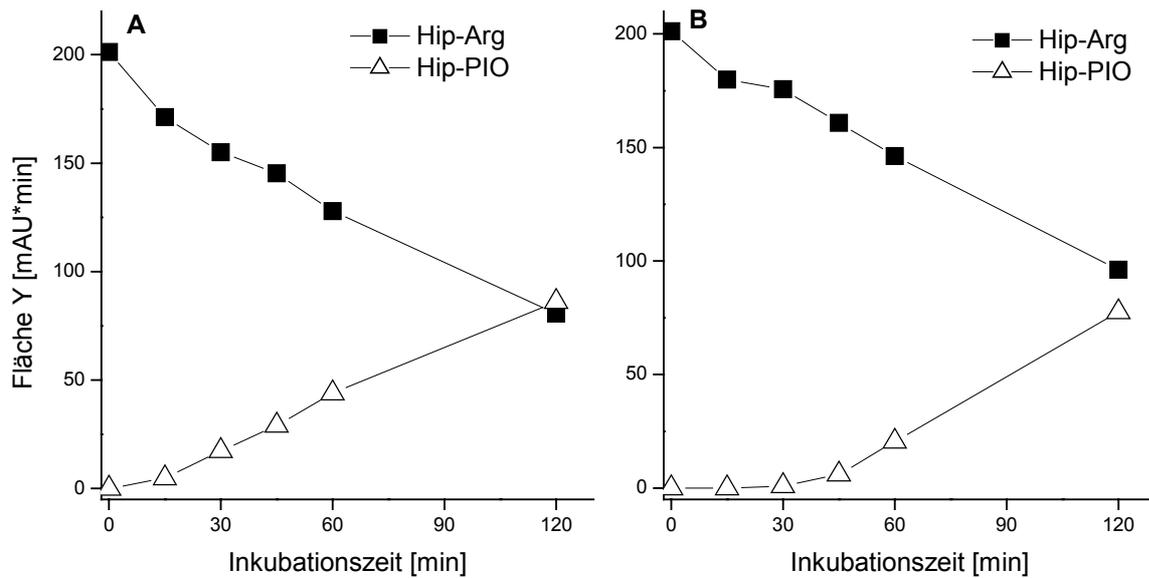


Abbildung 4.2.2.1-4: Abbau von Hip-Arg und Bildung von Hip-PIO im Laufe der Inkubation von **A** einer vorerhitzten Lactose Lösung (2 h, 100 °C) versetzt mit Hip-Arg und erneut inkubiert bis zu 2 h und **B** einer nicht vorbehandelten Lactose Lösung versetzt mit Hip-Arg und inkubiert bis zu 2 h bei 100 °C

In Abb. 4.2.2.1-5 sind Chromatogramme der oben beschriebenen Ansätze bei 60 min Inkubationszeit dargestellt (vgl. Abb. 4.2.2.1-4, **A** und **B**). Es ist anhand von Chromatogrammen eindeutig zu sehen, dass Hip-Arg mit Lactoselösung, die hitzebehandelt wurde, gezielt zum Hip-PIO reagiert (Abb. 4.2.2.1-5, **A**).

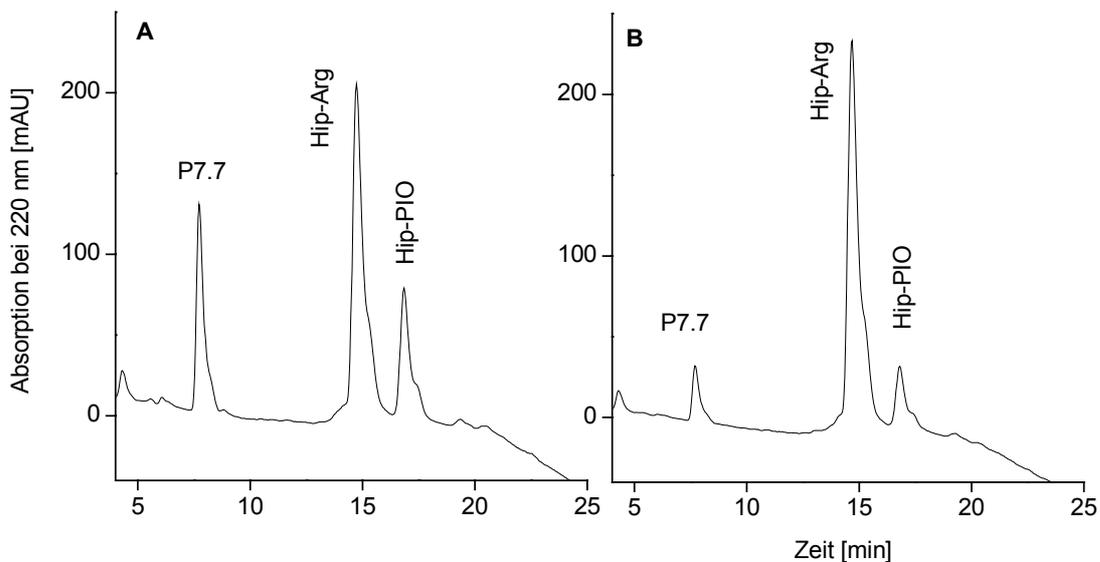


Abbildung 4.2.2.1-5: RP-HPLC Chromatogramme gemessen im UV bei 220 nm von **A** Lactose (vorbehandelt, 2 h, 100 °C):Hip-Arg, in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 (1 h, 100 °C) und **B** Lactose (nicht vorbehandelt): Hip-Arg, in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 (1 h, 100 °C)

Des Weiteren sind keine bei 220 nm absorbierenden Reaktionsprodukte detektierbar, was darauf hindeutet, dass keine weiteren Hippurylderivate während der Reaktion gebildet wurden.

Eindeutige Bestätigung der Bildung von Hip-PIO in diesen Inkubationsansätzen erfolgte mittels LC-MS Messung im positiven Modus, wo die für Hip-PIO zu erwartende Masse m/z von 434,4 gemessen als $[MH]^+$ gemessen werden konnte (vgl. 4.1.1).

4.2.2.2 Isolierung und Strukturaufklärung von Y

Da es sich bei Y wahrscheinlich um eine neue bisher in der Literatur nicht beschriebene, aus dem Lactoseabbau stammende 1,2-Dicarbonylverbindung handelt, die gleichzeitig auch der Precursor von PIO sein dürfte, erfolgte die Isolierung von diesem Chinoxalin mittels semi-präparativer RP-HPLC. Dies wurde analog zur Isolierung von 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (Abb. 4.2.1.3-4, **64**) durchgeführt, indem eine 0,18 molare Lactoselösung in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 mit einer 0,2 %-igen wässrigen o-Phenylendiaminlösung versetzt und 2 h bei 100 °C inkubiert wurde (vgl. 3.4.2.4). Untersuchungen an Lactoseansätzen im Zusammenhang mit Chinoxalin Y zeigten, dass es sich ähnlich wie Methylglyoxal (*Glomb, 2000*) verhält und durch die Inkubation in Anwesenheit von o-Phenylendiamin seine Bildung induziert wird. Diese Eigenschaft wurde für seine Bildung im Modellansatz und anschließende Isolierung ausgenutzt. Die Isolierung von Y erfolgte mittels semi-präparativer RP-HPLC im UV bei 312 nm (siehe 3.3.2.3) unter denselben Trennbedingungen wie für 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**64**). Fraktionen der bei ca. 15 min Retentionszeit eluierenden Verbindung an der semi-präparativen RP-HPLC wurden vereinigt, gefriergetrocknet und zur Strukturaufklärung mittels LC-MS, ESI-TOF-MS, sowie 1D- und 2D-NMR Untersuchung gegeben.

Wie in Kapitel 4.2.2 dargestellt, wurde eine LC-MS Messung des gesamten Lactoseinkubationsansatzes vorgenommen und eine Massezahl m/z gemessen als $[MH]^+$ für Y von 189,11 bestimmt (Abb. 4.2.2.1-2). Diese Masse konnte an der isolierten Verbindung mittels ESI-TOF-MS Messung wie in Abbildung 4.2.2.2-1 dargestellt eindeutig bestätigt werden. In Abbildung ist für das Natrium-Addukt des Chinoxalins charakteristische Masse $[MNa]^+$ von 211,11 zu sehen.

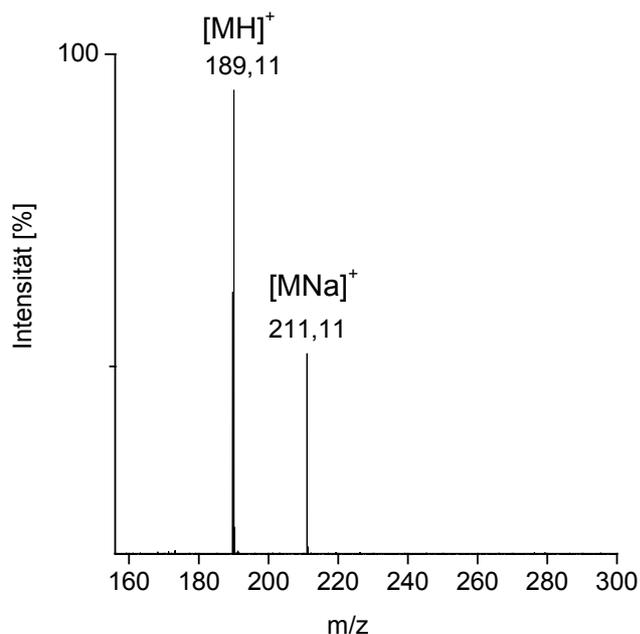


Abbildung 4.2.2.2-1: Massenspektrum des isolierten Chinoxalins Y gemessen mittels ESI-TOF-MS

Die molare Masse von Chinonaxalin Y beträgt somit 188,11 und konnte keinem der in der Literatur beschriebenen Chinoxaline zugeordnet werden (*Nedvidek et al., 1992*). Die Guanidinogruppe des Arginins reagiert mit einer C5-1,2-Dicarbonylverbindung zum Imidazolinonring von PIO (Abb. 4.1.1-4, **62**). Da diese 1,2-Dicarbonylverbindung nur eine Hydroxylgruppe am C3'-Atom der Propylkette aufweist (vgl. 4.1.2), ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dem isolierten Chinoxalin um das Derivat der 3,4-Didesoxy-pentosulose (3,4-DDPs) (Abbildung 4.2.2.2-2, **65**) handelt. 3,4-Didesoxy-pentosulose ist eine Verbindung, deren Bildung aus dem Abbau von Kohlenhydraten während der Maillard-Reaktion oder der Karamellisierung bislang nicht bekannt war. Bei der isolierten Chinoxalinverbindung könnte es sich somit um das Chinoxalin der 3,4-Didesoxy-pentosulose, das 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) handeln.

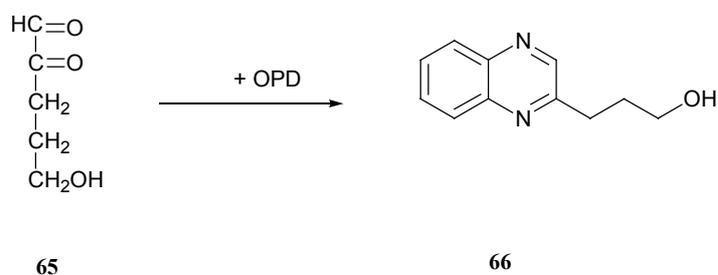
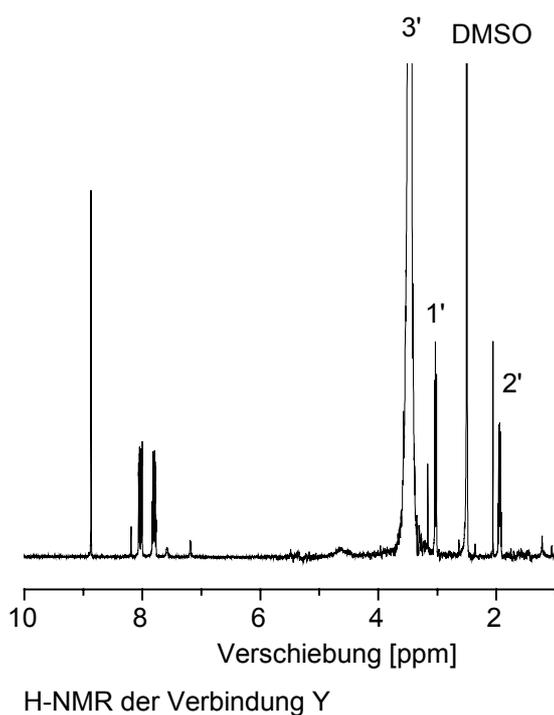


Abbildung 4.2.2.2-2: Strukturformel des aus 3,4-Didesoxy-pentosulose (**65**) aus der Reaktion mit o-Phenylendiamin entstehenden Chinoxalins 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**)

Eine eindeutige Strukturaufklärung von Y war erst mit der NMR spektroskopischen Untersuchungen möglich. In Abbildung 4.2.2.2-3 ist das ^1H - und ^{13}C -NMR Spektrum des isolierten Chinoxalins dargestellt. Vergleicht man nun das ^{13}C -Spektrum von 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (Abb. 4.2.1.3-3) mit dem ^{13}C -Spektrum von Y, so stellt man fest, dass es bei den beiden Spektren nur einen Unterschied in der Verschiebung am C2'-Atom gibt. Zum einen ist es aus dem Spektrum ersichtlich, dass C2' beim Chinoxalin Y sekundär substituiert ist im Vergleich zum C2' des 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalins, welches tertiär substituiertes C-Atom darstellt und eine OH-Gruppe aufweist. Aufgrund des Vorhandenseins der OH-Gruppe am C2'-Atom bei 2-(2',3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin erfolgt die Verschiebung im ^{13}C -Spektrum zum höheren Feld (71.43 ppm), wogegen die Verschiebung des C2'-Atoms bei Y 31.77 ppm beträgt, und einer CH_2 -Gruppe zuzuordnen ist. Die eindeutige Zuordnung der einzelnen C- und H-Atome erfolgte aus der Auswertung der HSQC und HMBC Spektren, wodurch die vermutete Struktur des 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalins (Abb. 4.2.2.2-2, **66**) eindeutig bestätigt werden konnte.



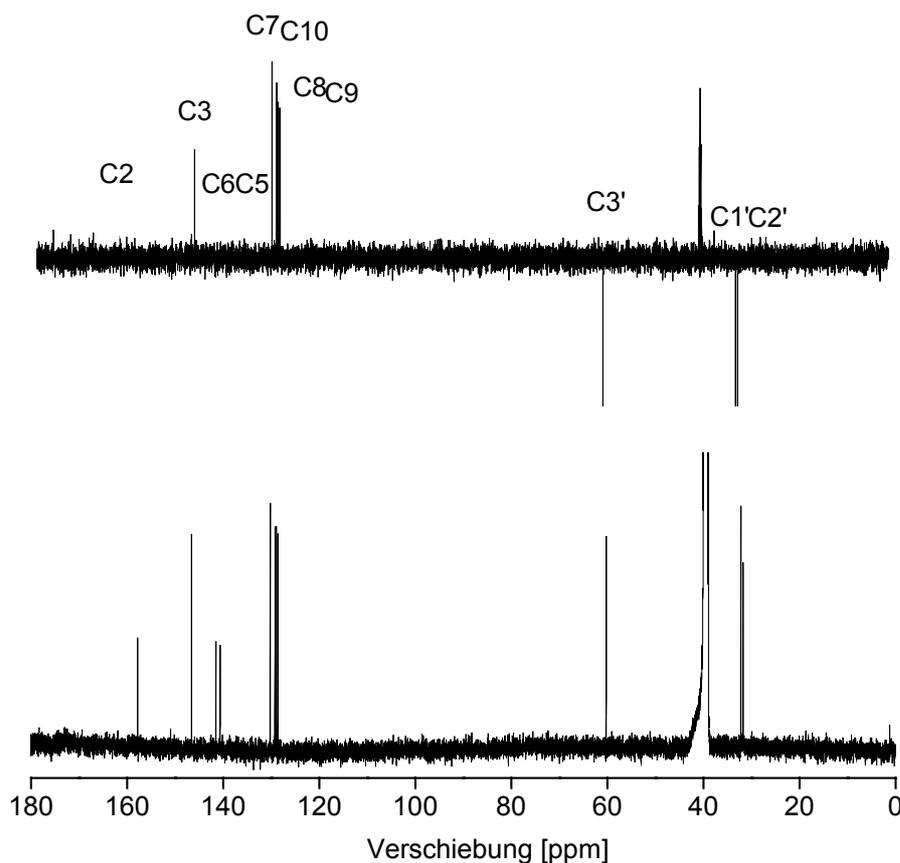


Abbildung 4.2.2.2-3: ¹H- und ¹³C-NMR Spektrum der Verbindung Y

Mit dem Nachweis und der Strukturaufklärung von 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) ist es gelungen, das Vorhandensein von 3,4-Didesoxypentosulose als eine aus dem Abbau von Kohlenhydraten stammende 1,2-Dicarbonylverbindung zum ersten Mal zweifelsfrei zu bestätigen.

Wie in Kapiteln 4.2.1.1 und 4.2.1.3 beschrieben sind aus dem Abbau von Lactose bisher nur zwei C5 1,2-Dicarbonylverbindungen als Folgeprodukte der Maillard-Reaktion aus der Literatur bekannt. Die 3-Desoxypentulose ist eine für den Abbau 1,4-verknüpfter Disaccharide charakteristische Verbindung. Dagegen kann 3-Desoxypentulose auch aus Monosacchariden gebildet werden, wird aber als ein aus dem Maltoseabbau stammendes Produkt diskutiert (Hollnagel & Kroh, 2001). Mit dem Nachweis des Chinoxalins der 3,4-Didesoxypentulose ist zum einen eine neue aus dem Lactoseabbau stammende 1,2-Dicarbonylverbindung identifiziert worden, zum anderen stellt sich die Frage, auf welchem Weg sie gebildet wird bzw. ob es sich um ein spezifisches Abbauprodukt der 1,4-glycosidisch verknüpften Disaccharide handelt. Weiterhin galt die Vermutung zu beweisen, dass die 3,4-Didesoxypentulose durch direkte Umsetzung mit Arginin zu einer Bildung von PIO führt.

4.2.2.3 Synthese und Strukturaufklärung von 3,4-Didesoxypentosulose

Da sich die Isolierung von 3,4-Didesoxypentosulose aus dem Lactoseinkubationsansatz (vgl. 3.5.1.1) als schwierig und zeitaufwendig aufwies, wurde der Versuch unternommen, sie direkt zu synthetisieren. Die Synthese basiert auf der Arbeit von *Charlesworth & Giesinger (1956)* und erfolgte wie in 3.4.2.3 beschrieben. Hierzu wurde 2,3,3-Trichlortetrahydro-2H-pyran (Abb. 4.2.2.3-1, **67**) unter Zusatz von Natriumcarbonat 10 h lang im Ölbad bei 37 °C inkubiert. Unter schwach basischen Bedingungen geht **67** in das 3,3-Dichloro-2-tetrahydropyranol (**68**) über. Im zweiten Syntheseschritt reagiert das 3,3-Dichloro-2-tetrahydropyranol während einer Inkubation von 30 min bei 37 °C im alkalischen Milieu (1 %-ige wässrige NaOH) zum 2-Hydroxy-3-tetrahydropyranon (**69**). Die Bildung von **69** wird stark vom pH-Wert beeinflusst. Ist das Milieu zu alkalisch, finden Abbaureaktionen von **69** statt. Im schwach Basischen bis Neutralen ist **69** relativ stabil.

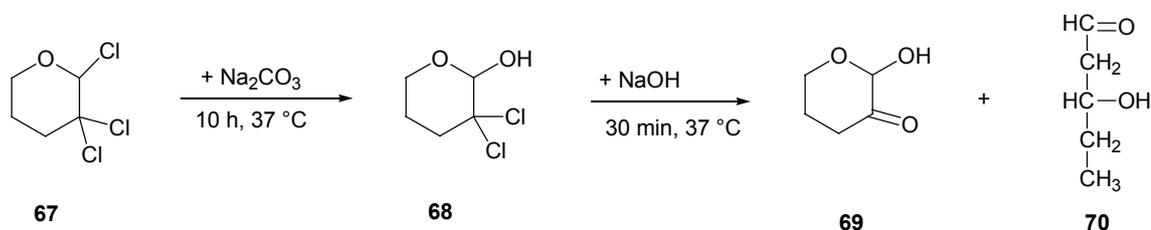


Abbildung 4.2.2.3-1: Synthese von 3,4-Didesoxypentosulose (**65**) als 2-Hydroxy-3-tetrahydropyranon (**69**) und des Nebenproduktes α -Oxo- γ -hydroxyvaleraldehyd (**70**) ausgehend von 2,3,3-Trichlortetrahydro-2H-pyran (**67**) über 3,3-Dichloro-2-tetrahydropyranol (**68**) (*Charlesworth & Giesinger, 1956*)

Jeder Schritt der Synthese wurde mittels RP-HPLC nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin auf die Anwesenheit von 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) geprüft. Gleichzeitig wurde eine Optimierung des zweiten Syntheseschrittes vorgenommen, indem **68** mit NaOH verschiedener Konzentrationen (von 0 %, über 1 %, 4 %, 8 % bis 12 %) umgesetzt wurde. Ab einer 4 %-igen wässrigen Lösung von Natronlauge finden Abbaureaktionen von **69** statt, so dass man bei einer 12 %-igen NaOH-Lösung das 2-Hydroxy-3-tetrahydropyranon nur als Minorkomponente nachweisen kann. Als optimale Konzentration für die Umsetzung wurde eine 1 %-ige wässrige Natronlauge ermittelt. Zur Reinigung von **69** aus dem Syntheseansatz wurde eine Säulenchromatographie an Kieselgel vorgenommen (vgl. 3.4.2.5). Die Fraktionierung der 3,4-Didesoxypentosulose erfolgte analog zu 3-Desoxypentulose. Fraktionen wurden mittels DC auf die Anwesenheit von 3,4-Didesoxypentosulose getestet. Die 3,4-Didesoxypentosulose weist einen dunkel-blauen Fleck auf der DC-Platte mit einem R_f -Wert von 0,9 auf. Die 3,4-DDPs-haltigen Fraktionen wurden vereinigt, eingeeengt und mehrmals mit dest. Wasser gewaschen. Hierbei wurde eine zähe, gelbe bis dunkel gelbe

Flüssigkeit gewonnen. Die Identitäts- und Strukturaufklärung erfolgten mittels RP-HPLC mit UV Detektion bei 312 nm, LC-MS bzw. ESI-TOF-MS und anschließend 1D- und 2D-NMR spektroskopischer Untersuchung.

Charlesworth & Giesinger (1956) beschreiben in ihrer Arbeit ein weiteres Reaktionsprodukt, welches in äquimolaren Mengen zu **69** entsteht, den α -Oxo- γ -hydroxyvaleraldehyd (**70**). Ein weiteres Reaktionsprodukt konnte im Syntheseansatz nach der Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin detektiert werden. Diese Verbindung zeigte eine dem Chinoxalin der 3,4-Didesoxypentosulose vergleichbare Retentionszeit. Ob es sich bei dieser Verbindung um α -Oxo- γ -hydroxyvaleraldehyd (**70**) handelt, müsste noch geprüft werden. Da dieses Reaktionsnebenprodukt durch die Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel entfernt werden konnte, wurden weitere Studien zur Strukturaufklärung dieses Reaktionsnebenproduktes nicht vorgenommen.

Die Umsetzung von **69** mit *o*-Phenylendiamin lieferte ein RP-HPLC Chromatogramm, welches mit dem in Abb. 4.2.2-1 **A** dargestellten Chromatogramm von isoliertem 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin übereinstimmte. Eine darauffolgende LC-MS Messung bestätigte die für das 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin erwartete Masse gemessen als $[MH]^+$ von 189,11. Somit kann man eindeutig sagen, dass mit der in Abb. 4.2.2.3-1 dargestellten Synthese die 3,4-Didesoxypentosulose als Hauptprodukt entsteht. Ein Nachweis von 3,4-Didesoxypentosulose in Form ihres Derivates 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) gelang zweifelsfrei sowohl aus der Inkubation von Lactose als auch ausgehend von 2,3,3-Trichlortetrahydro-2H-pyran (**67**).

Als schwierig stellte sich die eindeutige Strukturanalyse der freien 3,4-Didesoxypentosulose heraus. Die 3,4-Didesoxypentosulose ist eine reaktive Verbindung, die in Anwesenheit eines Reaktionspartners, z.B. einer Aminokomponente, sofort weiter reagiert (vgl. 4.2.2.1). Wie schon während der Optimierung der Synthese gezeigt werden konnte, ist die 3,4-Didesoxypentosulose im basischen Milieu instabil und wird schnell abgebaut. Die Messung mittels ESI-TOF-MS lieferte keine eindeutigen Aufschlüsse über die molare Masse von 3,4-Didesoxypentosulose. Aus der Auswertung der 1H - und ^{13}C -NMR Spektren war ersichtlich, dass es sich bei dem Isolat um ein Rohprodukt der Synthese handelte, und dass eine Strukturaufklärung der 3,4-Didesoxypentosulose nicht möglich war. Die 3,4-Didesoxypentosulose ist als freie Verbindung wahrscheinlich gar nicht fassbar, und ihre Struktur kann nur in Form des stabilen Chinoxalins aufgeklärt werden.

4.2.2.4 Umsetzung von 3,4-Didesoxypentosulose-Isolat mit N- α -Hippuryl-arginin bzw. mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin

Die nach 3.4.2.5 synthetisierte 3,4-Didesoxypentosulose wurde mit N- α -Hippuryl-arginin bzw. mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin wie in 3.5.1.3 beschrieben in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 gelöst bei 100 °C im Trockenschrank 30 und 60 min lang inkubiert. Aus diesen Inkubationsansätzen wurden Untersuchungen zur Bildung von Hip-PIO mittels RP-HPLC (vgl. 3.3.2.2), sowie zur Bildung von Boc-PIO und PIO nach der essigsäuren Hydrolyse von Boc-PIO (vgl. 3.4.1.2) mittels Aminosäureanalyse (vgl. 3.3.4.1) vorgenommen. In Abbildung 4.2.2.4-1, **A** ist das Chromatogramm des Reaktionsansatzes von N- α -Hippuryl-arginin mit 3,4-Didesoxypentosulose gemessen mittels RP-HPLC dargestellt. Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass keine weiteren Reaktionsprodukte entstehen, und dass N- α -Hippuryl-arginin gezielt zum Hip-PIO umgesetzt wird. Das Reaktionsprodukt von N- α -Hippuryl-arginin mit dem 3,4-Didesoxypentosulose-Isolat eluiert mit der gleichen Retentionszeit im Chromatogramm wie der Standard von Hip-PIO (Abb. 4.2.2.4-1, **B**). Die LC-MS Untersuchung bestätigte die für Hip-PIO bzw. Hip-Arg erwartete Massen (Abb. 4.1.1-1, **C**).

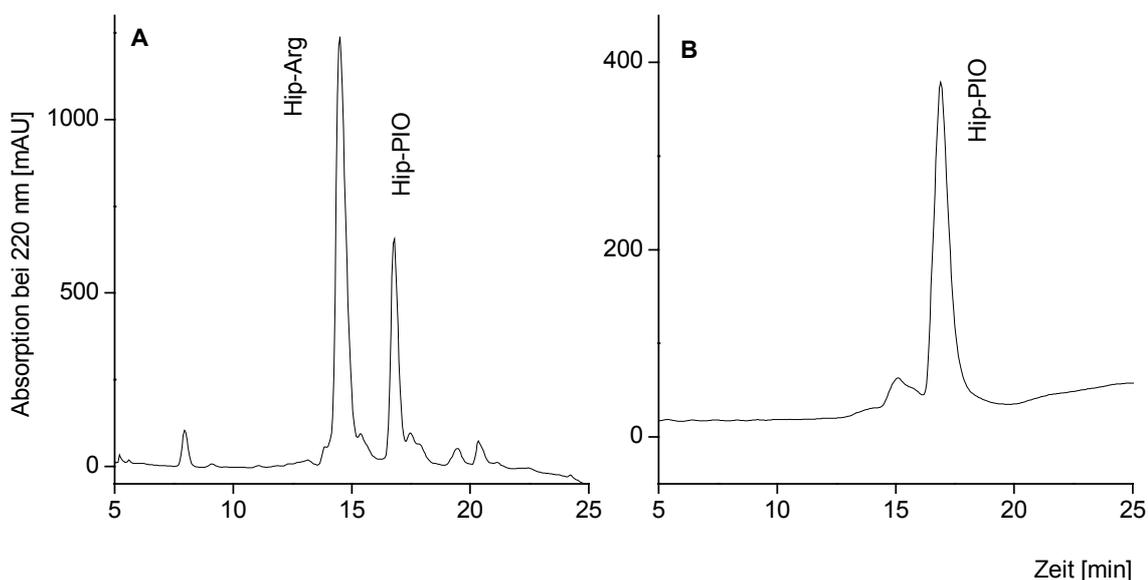


Abbildung 4.2.2.4-1: RP-HPLC Chromatogramme mit UV-Detektion bei 220 nm von: **A** Inkubationsansatz N- α -Hippuryl-arginin mit 3,4-Didesoxypentosulose-Isolat (30 min bei 100 °C) und **B** Hip-PIO Standard (0,5 mmol)

Im Inkubationsansatz von 3,4-Didesoxypentosulose mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin ist nach Hydrolyse mit Essigsäure zur Abspaltung der Boc-Gruppe ein Hauptreaktionsprodukt im Aminosäurechromatogramm (Abb. 4.2.2.4-2, **B**) zu sehen, dessen Retentionszeit mit der des PIO Standards (**A**) übereinstimmt.

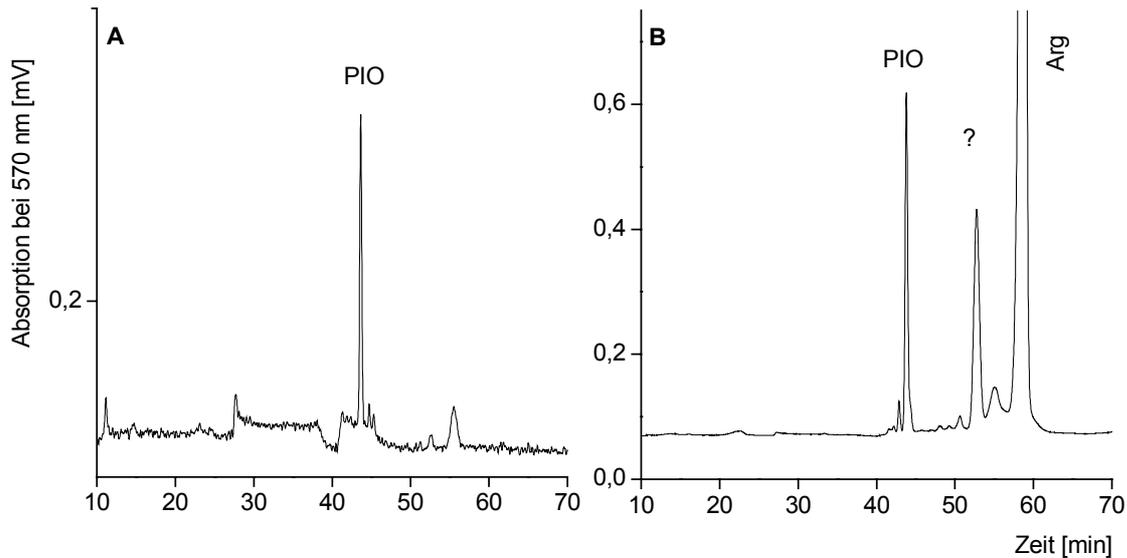


Abbildung 4.2.2.4-2: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von: **A** PIO Standard (2,5 nmol/ 20 μ l) und **B** Reaktionsansatz N-(tert-Butoxy-carbonyl)-L-arginin mit 3,4-Didesoxy-pentosulose (30 min, 100 $^{\circ}$ C) nach der Hydrolyse von der Boc-Gruppe

Des Weiteren ist im Chromatogramm **B** bei ca. 60 min Retentionszeit Arginin zu sehen. Bei dem mit Fragezeichen gekennzeichneten Signal im Chromatogramm könnte es sich entweder um ein weiteres Reaktionsprodukt von Arginin mit 3,4-Didesoxy-pentosulose oder um ein Hydrolyseprodukt von PIO handeln (vgl. 4.3.1.2), was wahrscheinlicher zu sein scheint, da dieses Nebenprodukt im Inkubationsansatz mit Hip-Arg nicht beobachtet werden konnte (Abb. 4.2.2.4-1, **A**).

Mit dem Nachweis von 3,4-Didesoxy-pentosulose ist es gelungen, eine bisher als Abbauprodukt von Disacchariden nicht beschriebene Verbindung zu detektieren, zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären. Gleichzeitig konnte eindeutig anhand von zwei voneinander unabhängigen Reaktionsansätzen und Messmethoden nachgewiesen werden, dass 3,4-Didesoxy-pentosulose der direkte Precursor von PIO ist und sehr schnell und gezielt mit der Guanidinogruppe des Arginins reagiert.

4.2.2.5 Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von 3,4-Didesoxy-pentosulose

Zur Untersuchung des Bildungsmechanismus der 3,4-Didesoxy-pentosulose wurden analog zu den Studien zur PIO-Bildung (vgl. 4.2.1) 10 mmolare Kohlenhydratlösungen, (Glucose, Galactose, Raffinose, Maltose und Lactose) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bei 100 $^{\circ}$ C im Trockenschrank bis zu 2 h lang erhitzt (vgl. 3.2.2.1 und 3.5.1.3). Nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin wurden diese Lösungen auf die Chinoxaline bzw. auf das 2-(3'-

Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) untersucht. In den hitzebehandelten Lösungen von Glucose, Galactose und Raffinose konnte keine Bildung von 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) verzeichnet werden. Dagegen war in erhitzten Maltose- und Lactose-Lösungen das 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) das Hauptprodukt im Chromatogramm. 3,4-Didesoxy-pentosulose stellt damit ein spezifisches Produkt des Abbaus von 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden dar.

In weiteren Untersuchungen zum Bildungsmechanismus von 3,4-Didesoxypentosulose wurden zwei parallel laufende Versuche durchgeführt, indem 10 mmolare Lactose-Lösungen in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, 2 h lang bei 100 °C unter Rückfluß bzw. im Trockenschrank mit und ohne N₂-Spülung inkubiert wurden. Die Inkubationsansätze wurden mittels RP-HPLC auf die Bildung von Hip-PIO bzw. auf die Bildung von 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) untersucht. Unter "oxidativen Bedingungen" (d.h. ohne N₂-Spülung bei einer Inkubation der Ansätze unter Rückfluß) erfolgte keine Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose. Eine Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose war nur messbar, wenn Lactose unter Rückfluß mit N₂-Spülung erhitzt wurde. Der Unterschied zwischen der Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose unter oxidativen bzw. nicht-oxidativen Bedingungen ist in Abbildung 4.2.2.5-1, A dargestellt.

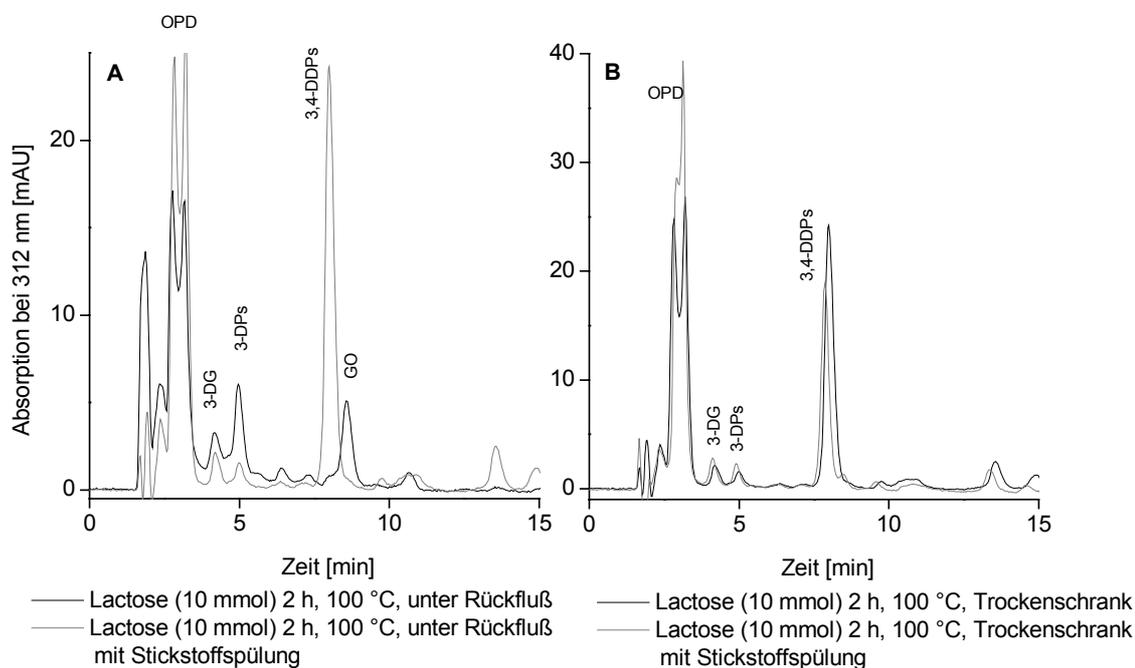


Abbildung 4.2.2.5-1: RP-HPLC Chromatogramm mit der UV Detektion gemessen bei 312 nm von **A** Lactoseansatz (10 mmol) inkubiert unter Rückfluß 2 h bei 100 °C mit und ohne N₂-Spülung; **B** Lactoseansatz (10 mmol) inkubiert im Trockenschrank 2 h bei 100 °C mit und ohne N₂-Spülung vor der Erhitzung

Für die Inkubationsversuche in Schottröhrchen mit Schraubverschluss im Trockenschrank waren keine großen Unterschiede zu sehen, was auch zu erwarten war, da in verschlossenen Röhrchen nur ein begrenztes Volumen an Sauerstoff zur Verfügung steht, welches dann relativ schnell im Laufe der Reaktion verbraucht wird. Es ist nur eine leicht erhöhte Bildung von 2-(3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin (**66**) für die mit N₂ gespülten Proben zu verzeichnen (Abb. 4.2.2.5-1, **B**).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bildung von Glyoxal und Glucoson aus Glucose oxidativ verläuft. Dagegen werden 3-Desoxyglucosulose, 1-Desoxyglucosulose und Methylglyoxal auf nicht-oxidativem Weg gebildet (Glomb, 2001). Anhand der oben beschriebenen Untersuchungen, kann man sagen, dass auch die Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose auf nicht-oxidativem Weg verläuft.

Analog wurde Hip-Arg mit Lactose (molares Verhältnis 1:100) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit und ohne N₂-Spülung bei 100 °C 2 h lang unter Rückfluß umgesetzt. Unter "nicht-oxidativen" Bedingungen ist eine unerwartet hohe Bildung an Hip-PIO zu verzeichnen (Abb. 4.2.2.5-2, **B**). Es ist deutlich zu sehen, dass Hip-Arg in kurzer Zeit zu mehr als 40 % zu Hip-PIO umgesetzt wird, wogegen aus Abb. 4.2.2.5-2 **A** ersichtlich ist, dass die Reaktion unter oxidativen Bedingungen, aufgrund der geringen Bildungsrate von 3,4-Didesoxypentosulose nur bedingt stattfindet.

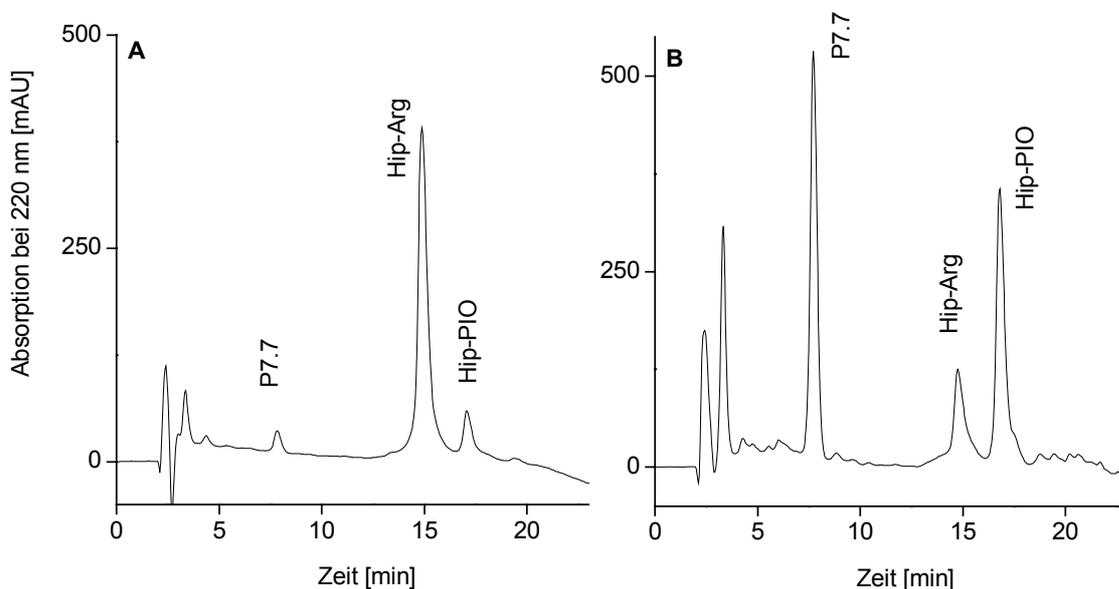


Abbildung 4.2.2.5-2: RP-HPLC Chromatogramm gemessen im UV bei 220 nm von **A** Lactose und Hip-Arg (100:1, molares Verhältnis) inkubiert bei 100 °C, 2 h unter Rückfluß, oxidative Bedingungen; **B** Lactose:Hip-Arg (100:1, molares Verhältnis) inkubiert bei 100 °C, 2 h unter Rückfluß, N₂-Spülung

In Abb. 4.2.2.5-3 ist ein möglicher Bildungsmechanismus von 3,4-Didesoxypentosulose ausgehend von Lactose (**27**) dargestellt.

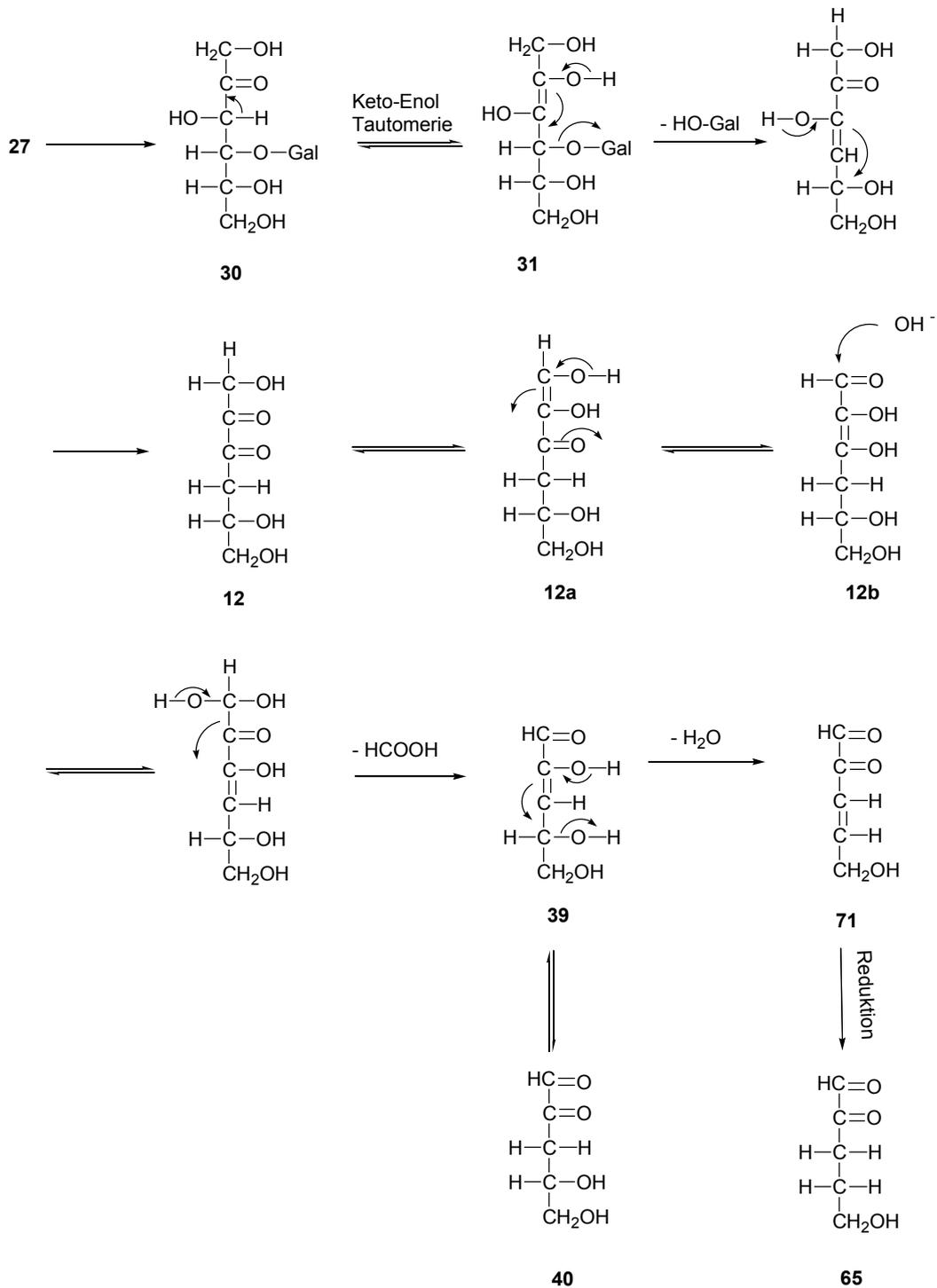


Abbildung 4.2.2.5-3: Möglicher Bildungsweg der 3,4-Dideoxypentosulose (**65**) aus Lactose (**27**) über die Bildung von Lactulose (**30**) und das 2,3-Endiol (**31**)

Wie in 2.2.1 erläutert, erfolgt eine 1,2-Enolisierung von Lactose (**27**) unter Ausbildung von Lactulose (**30**), die einer Keto-Enol-Tautomerie unterliegt, und ein 2,3-Endiol (vgl. Abb. 2.2.1-2, **31**) bildet. Durch die Eliminierung von Galactose und Wasserabspaltung kommt es

zur Ausbildung eines 4-Desoxyosons (**12**), welches in Folge einer Keto-Enol-Tautomerie als Redukton (**12a** oder **12b**) mit einer Keto-Endiol-Struktur vorliegen kann. Aus **12** kann es alkaliinduziert zur Abspaltung von Ameisensäure und Bildung eines Pentosederivates (**39**) kommen, wobei die 3-Desoxypentosulose (**40**) entsteht (vgl. 2.2.2.2). Aus **39** könnte durch Wasserabspaltung über das Intermediat (**71**) und nachfolgender Reduktion dann die 3,4-Didesoxypentosulose (**65**) entstehen. Da die 3,4-Didesoxypentosulose (**65**) auf nicht-oxidativem Weg gebildet wird, ist es möglich, dass an ihrer Bildung das Redukton (**12**) beteiligt ist. So könnte eine Reduktion von **71** durch das Redukton (**12a**) direkt zur Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose (**65**) führen (Belitz *et al.*, 2001). Aus **12a** könnte dabei eine instabile Tricarboxyverbindung (**72**) entstehen (Abb. 4.2.2.5-4).

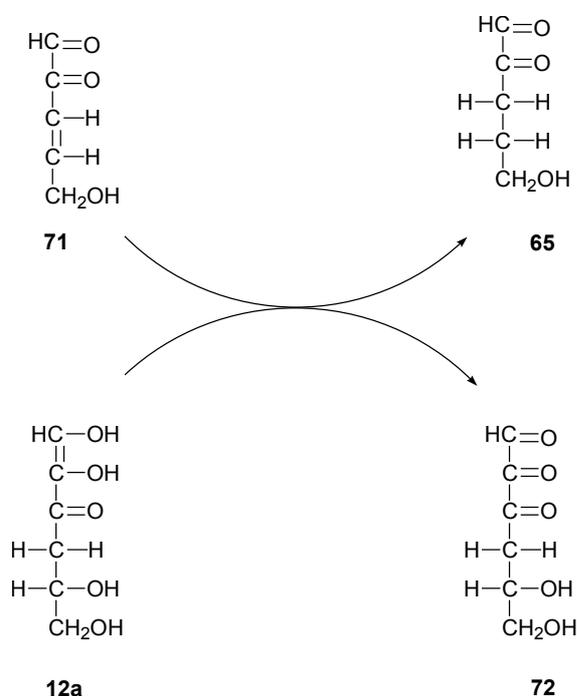


Abbildung 4.2.2.5-4: Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose (**65**) aus dem Redukton **12a**

4.3 Studien zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) in Modellansätzen

Die Ermittlung der optimalen Bedingungen zur Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) und zum Abbau von N- α -Hippuryl-arginin (Hip-Arg) wurden untersucht. Hierbei wurden Reaktionsparameter wie der pH-Wert, die Temperatur und die Dauer der Inkubation sowie der molare Anteil an Lactose im Reaktionsansatz optimiert. Des Weiteren erfolgte die Untersuchung bezüglich der Bildung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-

L-ornithin (PIO) in Modellansätzen aus Casein und Lactose bzw. Casein und 3,4-Didesoxypentosulose, sowie Untersuchungen zur Freisetzbarkeit von PIO aus dem Proteinverband.

4.3.1 Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxoimidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO) in Modellansätzen

pH- und Temperaturabhängigkeit der Bildung von 2-(2-Benzoylamino-acetylamino)-5-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxoimidazol-2-yl]-L-ornithin (Hip-PIO)

Zur Untersuchung zum Bildungsverhalten von Hip-PIO in Modellansätzen wurde eine 1 mmolare Lösung von Hip-Arg in 0,5 M Phosphatpuffer mit einer 10 mmolaren Lösung von Lactose in 0,5 M Phosphatpuffer versetzt (molares Verhältnis 1: 10) und inkubiert (vgl. 3.2.3). Zur Untersuchung zur Abhängigkeit der Bildung von Hip-PIO vom pH-Wert wurde 0,5 M Phosphatpuffer mit KOH auf pH-Werte von 6, 7, 8 und 9 eingestellt (vgl. 3.2.3.1) und die so hergestellten Modellansätze wie in 3.2.3.2 beschrieben bei 100 °C, 120 °C und 150 °C bis zu 6 h lang in einem vortemperierten Sandbad inkubiert. Die Bildung von Hip-PIO bzw. der Abbau von Hip-Arg in Abhängigkeit vom pH-Wert bei 100 °C ist in Abbildung 4.3.1-1 dargestellt. Im schwach Sauern bei pH 6,0 kann die Bildung von Hip-PIO (Abb. 4.3.1-1, **B**) nur in Spuren verzeichnet werden. Gleichzeitig beträgt der Abbau von Hip-Arg ca. 4 % (Abb. 4.3.1-1, **A**). Mit steigendem pH-Wert erfolgt ein schnellerer Abbau von Hip-Arg und gleichzeitig eine höhere Bildungsrate von Hip-PIO. Das optimale Abbau- und Bildungsverhältnis von Hip-Arg und Hip-PIO ist zwischen pH 7 und pH 8 zu beobachten. Im Basischen bei pH 9,0 ist zwar die Abbaurate von Hip-Arg nach 2 h Inkubationszeit am größten, jedoch nimmt die Bildungsrate von Hip-PIO ab, aufgrund der hier stattfindenden alkalischen Hydrolyse.

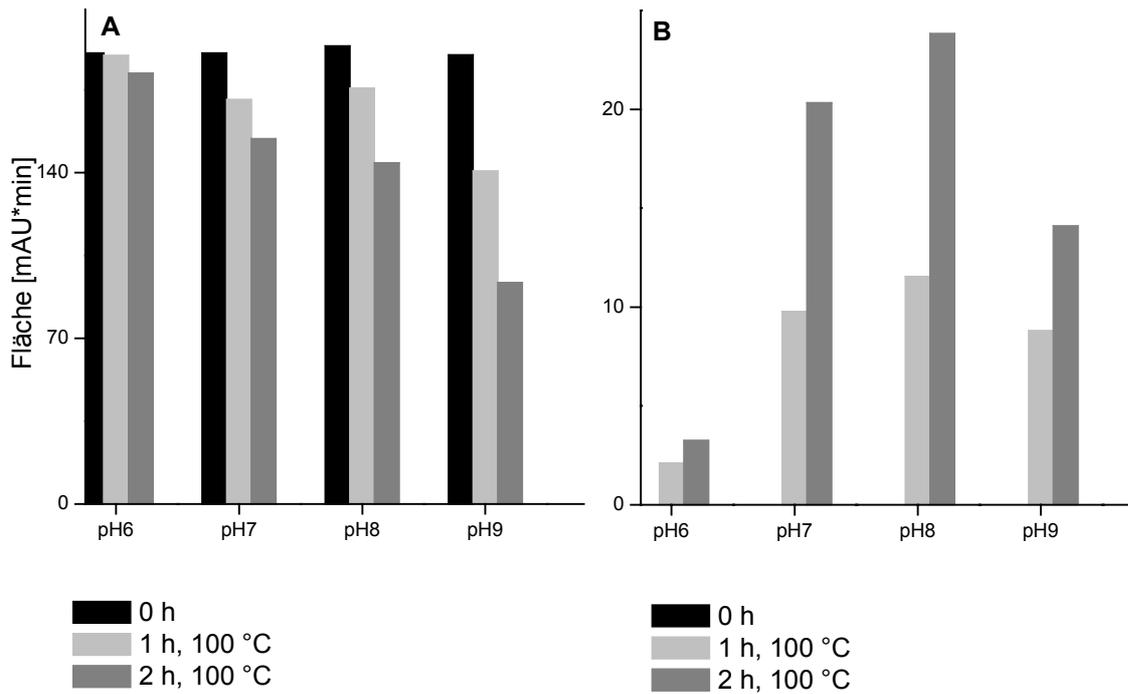


Abbildung 4.3.1-1: pH-Abhängigkeit der Umsetzung von Hip-Arg und Lactose (1:10 molares Verhältnis): **A** Abbau von Hip-Arg bei 100 °C und pH 6,0 bis pH 9,0; **B** Bildung von Hip-PIO bei 100 °C und pH 6,0 bis pH 9,0

Des Weiteren wurde der Einfluß der Inkubationsdauer bei 100 °C auf die Bildung von Hip-PIO untersucht. Hierzu wurden die unter 3.2.2.1 beschriebenen Probenansätze aus Hip-Arg und Lactose (molares Verhältnis 1:10) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, bis zu 6 h lang bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Als optimale Inkubationsdauer wurde eine Umsetzung von 4 h bei 100 °C ermittelt. Bei einer Inkubationszeit von 300 min und 360 min ist zwar die Bildung von Hip-PIO von der Fläche her höher als nach 240 min, jedoch werden dabei verstärkt Nebenprodukte gebildet, so dass keine ausreichende Trennung einzelner Peaks im HPLC Chromatogramm gegeben ist. Bei den längeren Inkubationszeiten findet ein Abbau von Hip-PIO statt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Temperatur von 100 °C optimal für die Bildung von Hip-PIO ist. Ist die gewählte Reaktionstemperatur niedriger als 100 °C, so verlängert sich die Reaktionszeit und die Ausbeute ist entsprechend geringer (*Kumpf et al., 2003*). Bei Temperaturen höher als 100 °C laufen unerwünschte Nebenreaktionen ab, so dass die Ausbeute an Hip-PIO gering ist. Aus der Abbildung 4.3.1-2, **B** ist ersichtlich, dass bei 150 °C das Maximum an Hip-PIO nach nur 30 min Inkubationsdauer erreicht ist, dieses aber im weiteren Verlauf der Inkubation wieder abgebaut wird. Dagegen ist eine stetige Zunahme der Fläche an Hip-PIO bei 100 °C Inkubationstemperatur bei gleichzeitigem gleichmäßigem Hip-Arg Abbau zu verzeichnen (Abb. 4.3.1-2, **A**).

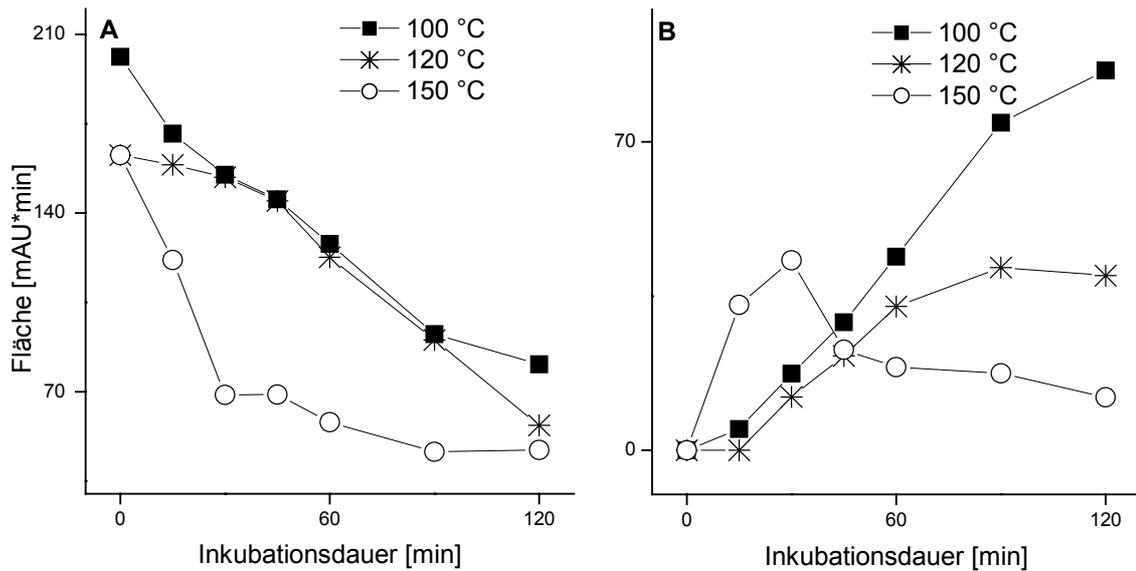


Abbildung 4.3.1-2: Temperaturabhängigkeit der Umsetzung von Hip-Arg und Lactose (1:10 molares Verhältnis) in Modellansätzen: (A) Abbau von Hip-Arg (B) Bildung von Hip-PIO

Variation des molaren Verhältnisses Hip-Arg: Lactose

Für die Synthese von Hip-PIO bzw. PIO wird ein molares Verhältnis von Arginin zu Lactose von 1 zu 5 gewählt (vgl. 3.4.1.1 und 3.4.1.2). Um zu prüfen, inwieweit die Bildung von PIO vom Anteil an Kohlenhydrat beeinflusst wird, wurde wie in 3.2.3.3 beschrieben, eine 1 mmolare Lösung von Hip-Arg in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 5- bis 100-fachem molarem Überschuss an Lactose versetzt. Die hierzu verwendeten Verdünnungen sind der Tabelle 3.2.3.3-1 zu entnehmen. Die so vorbereiteten Ansätze wurden für 2 h und 4 h bei 100 °C inkubiert. Wie in Abb. 4.3.1.2-3 zu sehen, korreliert die Bildung von Hip-PIO mit dem ansteigenden Anteil an Lactose. Nach 4 h Inkubationsdauer (Abb. 4.3.1.2-3, B) ist eine höhere Umsatzrate von Hip-Arg zu Hip-PIO bei allen Ansätzen zu verzeichnen. Beim hundertfachen molaren Überschuss an Lactose zu Hip-Arg sowohl nach 2 h als auch nach 4 h Erhitzungsdauer werden vergleichbare Mengen von Hip-PIO gebildet.

Betrachtet man nicht nur die Flächen der einzelnen Verbindungen, sondern auch die RP-HPLC-Chromatogramme der jeweiligen Ansätze, so sieht man, dass bei einem hundertfachen molaren Überschuss von Lactose zu Hip-Arg die Bildung von Hip-PIO gezielt stattfindet (Abb. 4.3.1.2-4). In Abb. 4.3.1.2-4 ist zu sehen, dass außer Hip-Arg und Hip-PIO keine weiteren bei 220 und 254 nm detektierbaren Reaktionsprodukte gebildet werden.

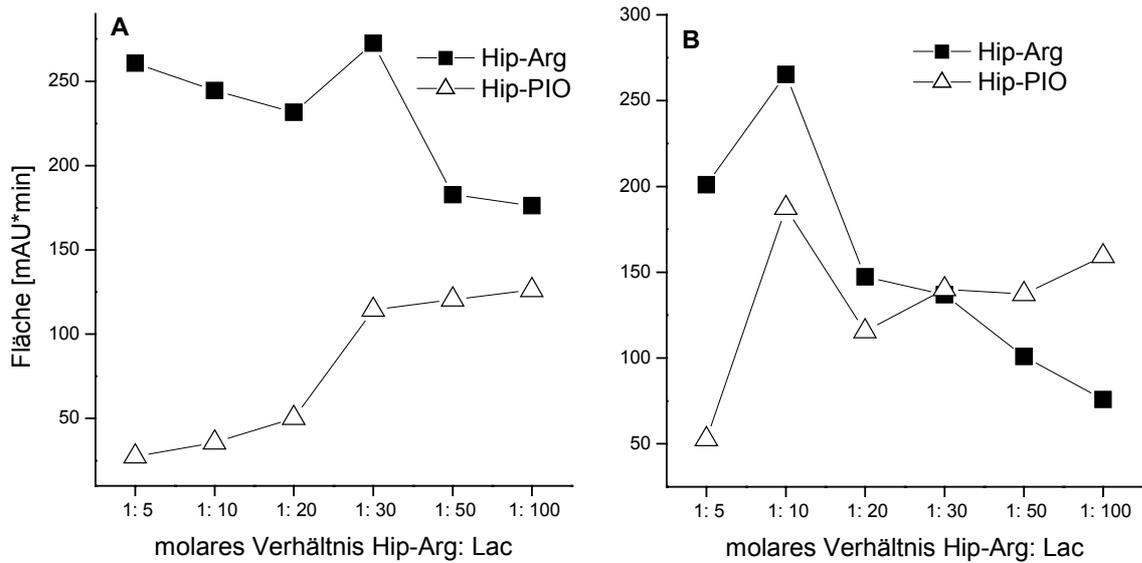


Abbildung 4.3.1.2-3: Umsetzung von Hip-Arg mit Lactose (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) in Abhängigkeit vom molaren Verhältnis inkubiert im Trockenschrank bei 100 °C für 2 h (A) und 4 h (B)

Der mit P7.7 gekennzeichnete Peak entsteht zwar als eines der Hauptreaktionsprodukte im Chromatogramm (Abb. 4.3.1.2-4, B), zeigt aber keine für den Hippurylrest charakteristischen Absorptionsmaxima im UV. Es konnte gezeigt werden, dass P7.7 auch in Inkubationsansätzen von reinen Lactoselösungen gebildet wird, so dass diese Verbindung kein Argininderivat darstellt. Das hier erzielte Ergebnis stimmt mit dem in Abbildung 4.2.2.5-2 dargestellten Ergebnis überein.

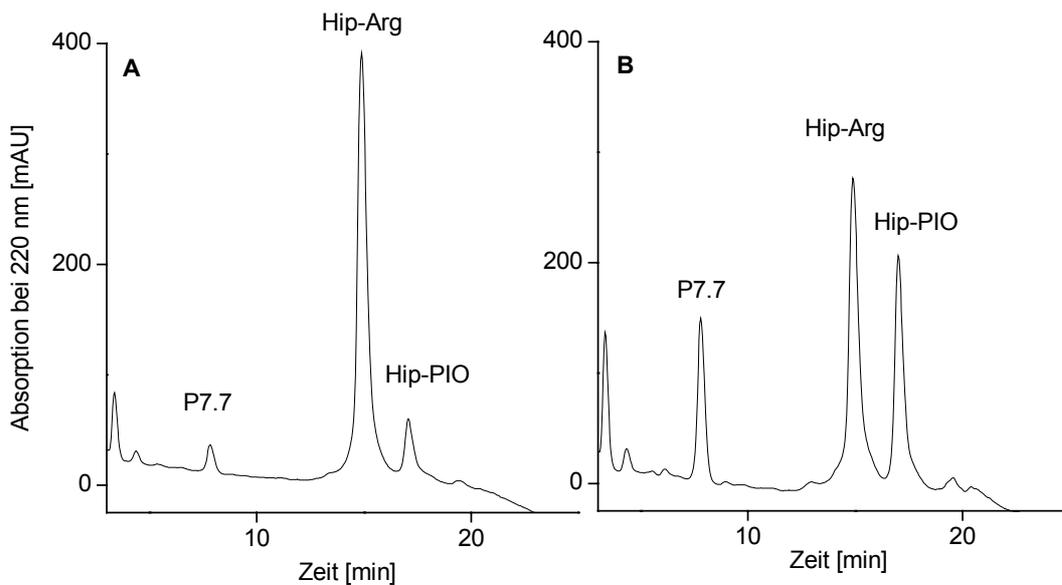


Abbildung 4.3.1.2-4: RP-HPLC-Chromatogramm mit UV-Detektion bei 220 nm von Inkubationsansätzen Hip-Arg:Lactose (molares Verhältnis 1:100) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, erhitzt bei 100 °C für A 2 h und B 4 h

Somit könnte man die Bildung von Hip-PIO bzw. von PIO für eine Synthese steigern, indem

man das molare Verhältnis von Lactose zu Arginin um das Hundertfache erhöht und die Inkubation unter reduzierenden Bedingungen durchführt (vgl. 4.2.2.5).

4.3.2 Enzymatische Hydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

4.3.2.1 Bestimmung von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Modellansätzen

Zur Bestimmung von PIO wurde das nach 3.4.1.2 synthetisierte PIO in Reinstwasser gelöst (1 mmol/l) und für die in 3.3.1.2 beschriebene dreistufige enzymatische Hydrolyse eingesetzt. Ein Abbau von PIO nach enzymatischer Hydrolyse konnte hierbei nicht verzeichnet werden. Die Wiederfindung von PIO in der Milchmatrix wurde durch Zudotierung einer Kondensmilch mit 0,5 μ mol PIO/ml zu 94 % bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass PIO-Standard unter den Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse stabil bleibt und selbst nicht abgebaut wird, was für die nachfolgenden Untersuchungen von Bedeutung ist, da dadurch eine Möglichkeit gegeben wäre, PIO in Lebensmitteln nach enzymatischer Hydrolyse zu bestimmen. Da es sich bei dem PIO-Standard um eine freie Aminosäure handelt, wurde zunächst Hip-PIO als peptidgebundenes Derivat enzymatisch hydrolysiert und mittels Aminosäureanalyse auf die Abbauprodukte untersucht. Im Hydrolysat wären Hippursäure, Glycin und PIO zu erwarten. Es wurde jedoch keins der möglichen Abbauprodukte nachgewiesen (*Kumpf et al., 2003*). Eine RP-HPLC Messung der Hippurylderivate nach enzymatischer Hydrolyse zeigte, dass eine Freisetzung von Hippursäure aus Hip-PIO nicht stattgefunden hat. Gleichzeitig konnte kein Abbau von Hip-PIO verzeichnet werden. Folglich bedeutet dies, dass eine Spaltung der Peptidbindung zwischen PIO und Glycin durch das hier angewandte Enzymsystem nicht erfolgt.

Untersuchungen zur Bildung von PIO am Protein wurden an Modellansätzen von Casein mit Lactose bzw. 3,4-Didesoxypentosulose nach enzymatischer und Säurehydrolyse vorgenommen. Hierzu wurde Casein wie in 3.2.2.2 beschrieben isoliert, in Lösung mit 20, 40, 80 und 100 μ l 3,4-Didesoxypentosulose (vgl. 3.4.2.5) versetzt und bis zu 1 h bei 100 °C inkubiert. Nach enzymatischer bzw. Säurehydrolyse wurden die Proben mittels Aminosäureanalyse auf PIO und seine Hydrolyseprodukte untersucht. Ein Abbau von Arginin konnte in beiden Hydrolysesystemen beobachtet werden. Die Umsetzung von Casein mit 100 μ l 3,4-Didesoxypentosulose (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) für 1 h bei 100 °C nach enzymatischer Hydrolyse ist in Abbildung 4.3.2.1-1 A gezeigt.

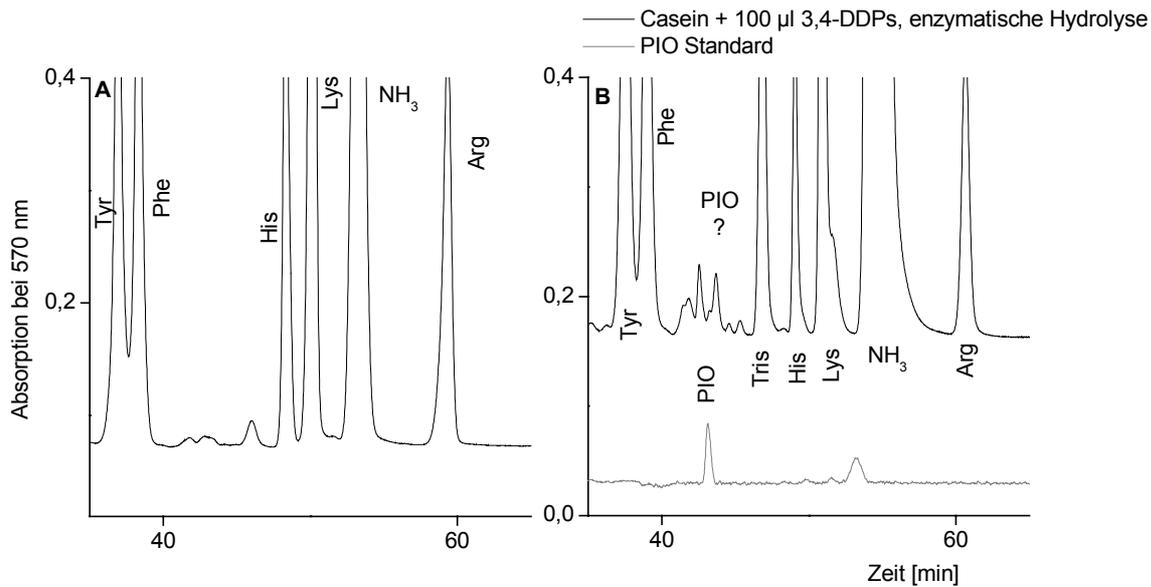


Abbildung 4.3.2.1-1: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von enzymatischen Hydrolysaten von **A** Casein (0 h und **B** der Umsetzung von Casein mit 100 µl 3,4-Didesoxypentosulose (1 h, 100 °C) überlagert mit PIO-Standard

Im Abb. 4.3.2.1-1 **A** ist eine zur gleichen Zeit wie PIO eluierende Verbindung zu sehen. Ob es sich hierbei um PIO handelt, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Weitere im Chromatogramm vorhandenen Signale könnten Abbauprodukte von PIO oder weitere Reaktionsprodukte des Arginins sein. Sollte es sich bei der mit PIO bezeichneten Verbindung im Chromatogramm tatsächlich um PIO handeln, muss damit gerechnet werden, dass möglicherweise der Gesamtgehalt an PIO im Protein nicht erfasst werden kann, da die hier verwendeten Enzyme wahrscheinlich PIO nicht vollständig aus dem Proteinverband freisetzen.

Das Chromatogramm des Säurehydrolysates von Casein mit 100 µl 3,4-Didesoxypentosulose ist in Abbildung 4.3.2.1-2 **B** gezeigt. Auch hier ist ein Signal zu sehen, das ausgehend von der Retentionszeit im Chromatogramm PIO zugeordnet werden kann. Da aus Voruntersuchungen bekannt ist, dass PIO eine säurelabile Verbindung ist, ist es zu erwarten, dass in Säurehydrolysaten PIO nur im Spurenbereich nachzuweisen ist, und dafür Abbauprodukte von PIO zu identifizieren sind. Der mit "A" bezeichnete Peak könnte ein Abbauprodukt von PIO sein (vgl. 4.3.3.1).

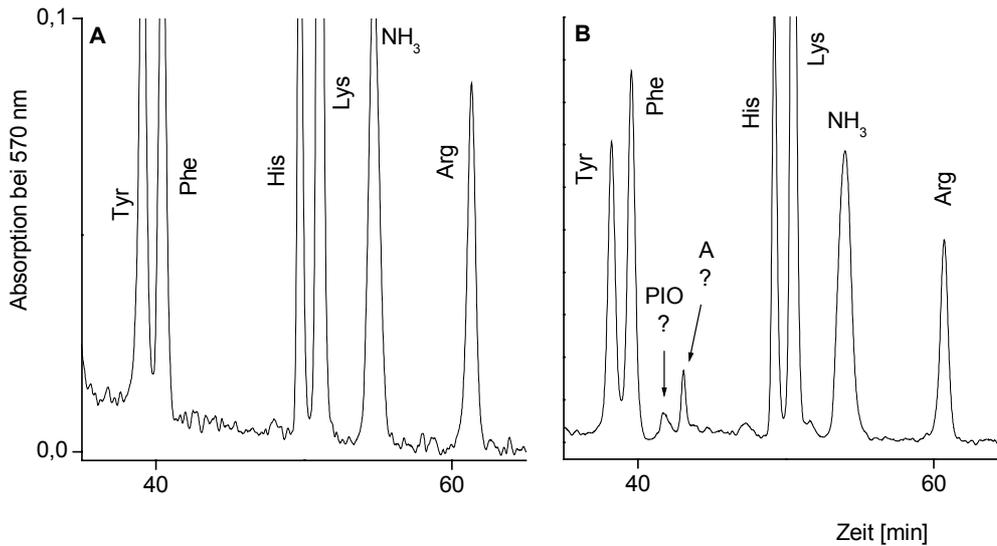


Abbildung 4.3.2.1-2: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von Säurehydrolysaten von **A** Casein, 0 h (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) und **B** Umsetzung von Casein mit 100 µl 3,4-Didesoxypentosulose (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0)

In den Inkubationsansätzen von Casein mit 3,4-Didesoxypentosulose ist ein eindeutiger Nachweis von PIO nicht gelungen. Da die Umsetzungen von 3,4-Didesoxypentosulose mit Arginin gezeigt haben, dass diese Reaktion gezielt zur Bildung von PIO führt (vgl. 4.2.2.4), und in Inkubationsansätzen mit Casein ein Abbau von Arginin von bis zu 20 % verzeichnet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass eine Freisetzung von PIO aus dem Proteinverband nach enzymatischer Hydrolyse nur zum Teil stattgefunden hat, bzw. dass PIO nach Säurehydrolyse zum größten Teil abgebaut wurde.

4.3.2.2 Bestimmung von N-δ-[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Lebensmittelmodellen und in Lebensmitteln

Zur Untersuchung zur Bildung von PIO bzw. Abbau von Arginin in Lebensmittelmodellen wurde Casein mit Lactose in einem molaren Verhältnis Lysin:Lactose von 1:10 bzw. 1:30 durchgeführt. Hierzu wurde Casein wie in 3.2.2.2 beschrieben isoliert, mit Lactose in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, vermischt und bei 100 °C bis zu 5 h lang hitzebehandelt (vgl. 3.2.2.3). Probenansätze wurden dann dialysiert, um den überschüssigen Zucker zu entfernen und enzymatischer bzw. Säurehydrolyse (vgl. 3.3.1.2) mit anschließender Aminosäureanalyse unterzogen. Ein Abbau von Arginin findet wie in 4.3.1 beschrieben in Abhängigkeit vom Anteil an Lactose im Reaktionsansatz sowie vom Hydrolysesystem unterschiedlich stark statt. In Abbildung 4.3.2.2-1 ist ein Overlay der Chromatogramme der enzymatischen Hydrolysate von Inkubationsansätzen Casein und Lactose (molares Verhältnis Lysin:Lactose 1:30) nach 0

h und 5 h bei 100 °C Erhitzung dargestellt. Ein Abbau von Arginin bezogen auf Valin-Äquivalente betrug hier 25 %.

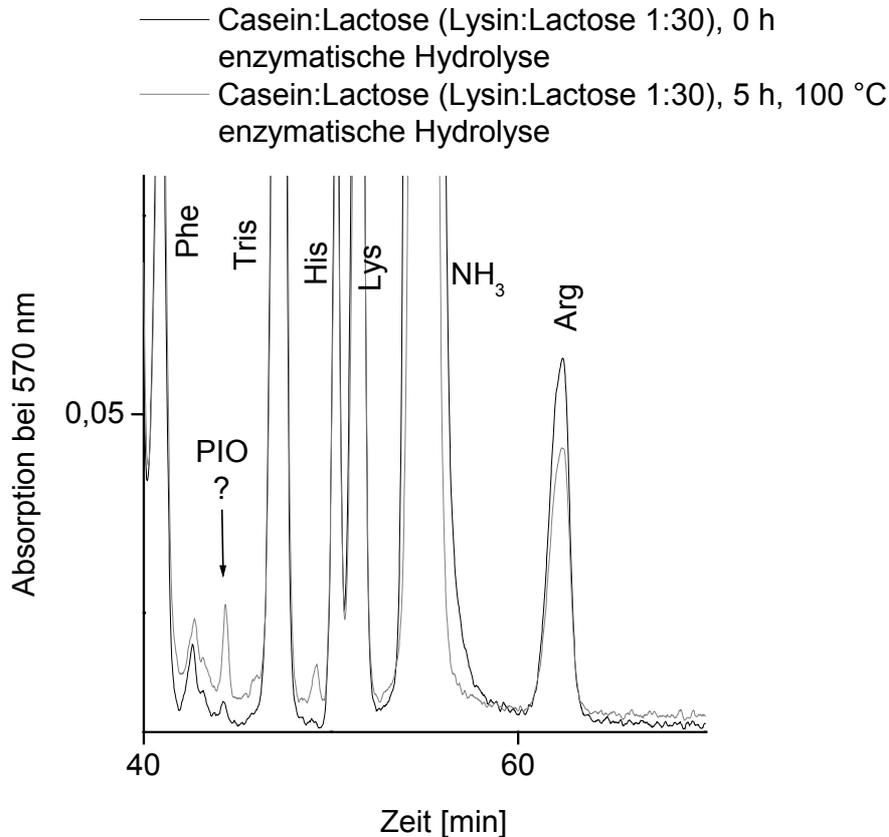


Abbildung 4.3.2.2-1: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von enzymatischen Hydrolysaten von Casein und Lactose Inkubationsansätzen (Lysin:Lactose molares Verhältnis 1:30) nach 0 h und 5 h bei 100 °C

Die Fläche des mit PIO gekennzeichneten Peaks nimmt mit der Erhitzungszeit zu. Da die Untersuchungen an Hip-PIO gezeigt haben, dass PIO enzymatisch nicht freigesetzt wird, wenn Glycin in benachbarter Stellung vorhanden ist, muss geprüft werden, ob es sich hier um den mit PIO gekennzeichneten Peak (Abb. 4.3.2.2-1) tatsächlich um PIO handelt.

In den gleichen Probenansätzen wurde Säurehydrolyse mit 6 N HCl durchgeführt und nach entsprechender Aufarbeitung der Aminosäureanalyse unterzogen. In Abbildung 4.3.2.2-2 sind Chromatogramme der Säurehydrolysate von Inkubationsansätzen Casein und Lactose (Lysin:Lactose molares Verhältnis 1:30) nach der Erhitzung für 0 h und 5 h bei 100 °C dargestellt. Ein Argininabbau bezogen auf Valin-Äquivalente nach 5 h Hitzebehandlung betrug 21 %. Auch in diesen Ansätzen kann eine Abnahme des als PIO bezeichneten Peaks nach 5 h Erhitzung beobachtet werden. Im Chromatogramm sind, vergleichbar zu Abb. 4.3.2.2-1, weitere Signale zu sehen, die wahrscheinlich aus dem Abbau von PIO, sowohl als Folge der Hitzebehandlung als auch der Säurehydrolyse, stammen.

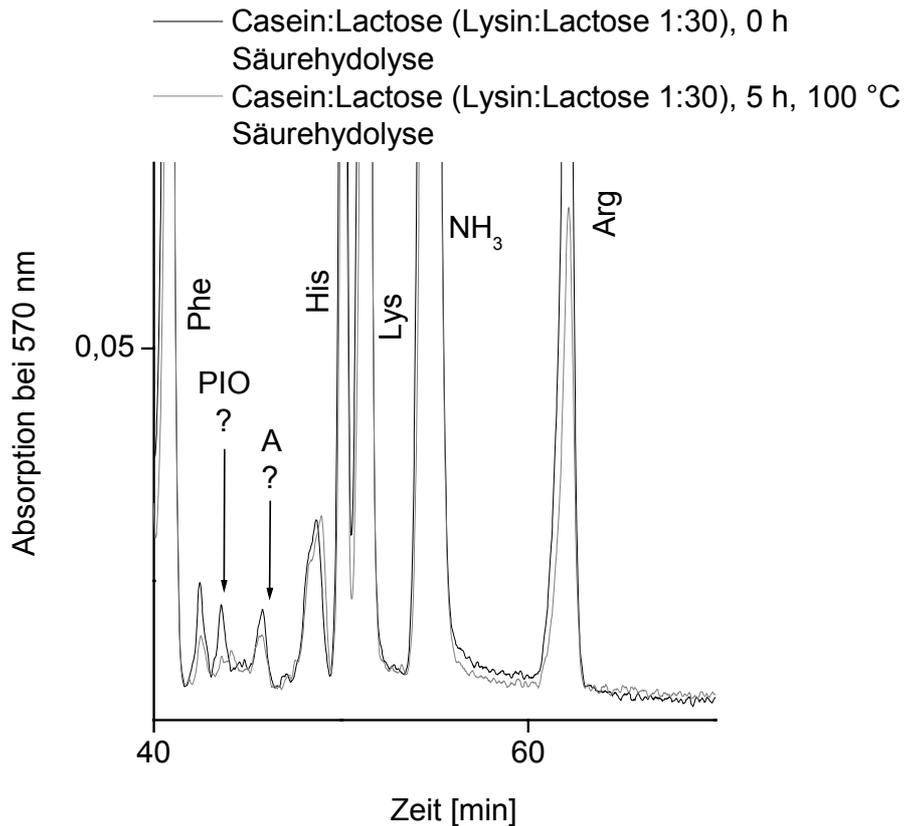


Abbildung 4.3.2.2-2: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von Säurehydrolysaten von Casein und Lactose Inkubationsansätzen (Lysin:Lactose molares Verhältnis 1:30) nach 0 h und 5 h bei 100 °C

Wie aus Abb. 4.3.2.2-2 ersichtlich, kommt es zu einer Zunahme der Peakfläche einer Verbindung mit identischer Retentionszeit wie PIO im Laufe der Hitzebehandlung, die jedoch alleine einer Argininderivatisierung von 20 bis 30 % nicht entsprechen kann. Folglich bedeutet dies, dass es weitere aus dem Abbau von PIO stammende Derivate geben muss, die mit der hier angewandten Messmethode nicht erfasst wurden. Eines der Hydrolyseprodukte von PIO ist die mit "A" bezeichnete Verbindung im Chromatogramm (vgl. 4.3.3.1). Untersuchungen zum Abbau von PIO bei der Säurehydrolyse wurden in weiteren Studien an PIO-Standard bzw. PIO-Synteseansatz vorgenommen (vgl. 4.3.3).

Ein Argininabbau wurde ebenfalls an Lebensmittelproben nach enzymatischer und Säurehydrolyse untersucht. Hierzu wurde Molkenpulver aufgrund seines hohen Gehaltes an Lactose gewählt. Molkenpulver wurde trocken für 72 h bei verschiedenen Temperaturen (50, 60 und 70 °C) nach enzymatischer Hydrolyse auf Argininabbau und Bildung von PIO mittels Aminosäureanalyse untersucht. In Abbildung 4.3.2.2-3, A ist ein Argininabbau proportional zur Inkubationstemperatur erkennbar. Berechnet als Valin-Äquivalente beträgt der Abbau von Arginin nach 72 h Erhitzung bei 70 °C nach enzymatischer Hydrolyse 21 %. Vergleicht man die in Abbildung 4.3.2.2-3 zwischen Phenylalanin und Histidin eluierende Verbindungen mit

dem in Abb. 4.3.2.1-1, A dargestellten PIO-Standard, so könnte man die zwischen Phenylalanin und Tris Puffer eluierende Verbindung als PIO bezeichnen.

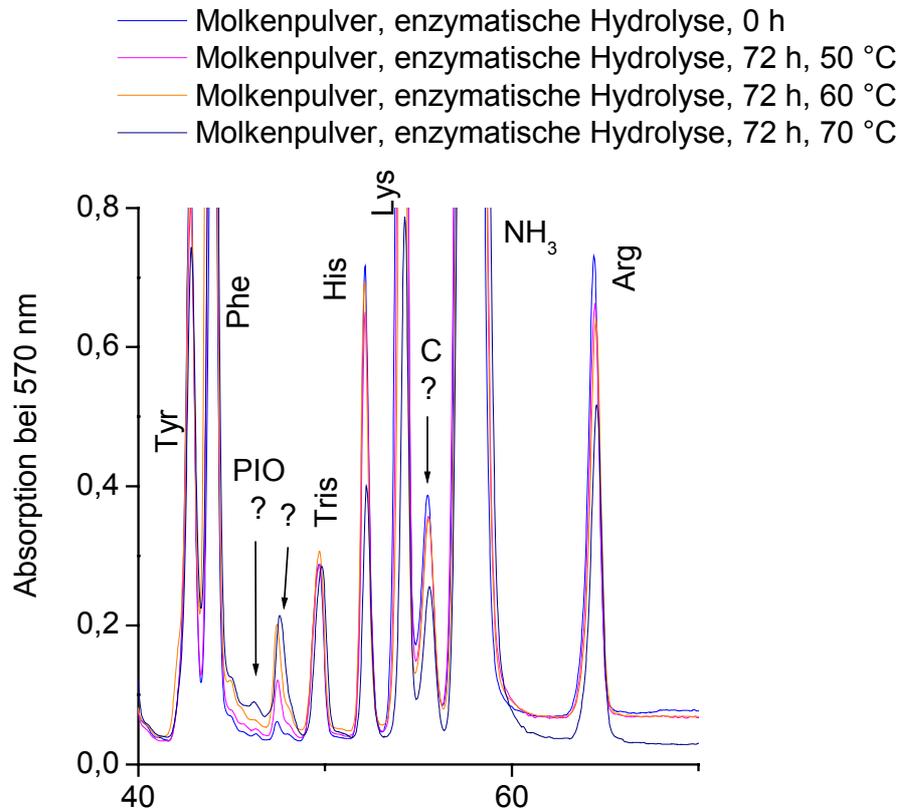


Abbildung 4.3.2.2-3: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von enzymatischen Hydrolysaten von Molkenpulver erhitzt im trockenen Zustand für 72 h bei 50, 60 und 70 °C

Aus der Abbildung 4.3.2.2-3 ist der Zusammenhang zwischen dem Argininabbau und der Bildung der als PIO bezeichneten Verbindung proportional zur Inkubationstemperatur ersichtlich. Dies weist darauf hin, dass es sich bei dieser Verbindung um ein Derivat des Arginins handeln könnte. Ob es sich hierbei gleichzeitig um PIO handelt, muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Die Fläche einer weiteren im Aminosäurechromatogramm nach Lysin eluierenden mit "C" bezeichneten Verbindung nimmt mit zunehmender Inkubationstemperatur ab (vgl. 4.3.3.1). Es ist wahrscheinlich, dass diese Verbindung nach Säurehydrolyse nicht nachweisbar ist, da die Säurehydrolyse bei 110 °C durchgeführt wird. Es könnte sich bei dieser Verbindung um ein weiteres Argininderivat handeln, das aufgrund seiner Hitzeempfindlichkeit als ein Parameter für die Beurteilung der Lagerung von Lebensmitteln herangezogen werden könnte.

In Abbildung 4.3.2.2-4 sind Overlay-Chromatogramme der Säurehydrolysate eines Molkenpulvers, inkubiert im trockenen Zustand für 0 und 2 h bei 100 °C, dargestellt. Ein

Argininabbau nach 2 h Hydrolyse bei 100 °C konnte zu 10 % (ausgedrückt in Valin-Äquivalenten) bestimmt werden.

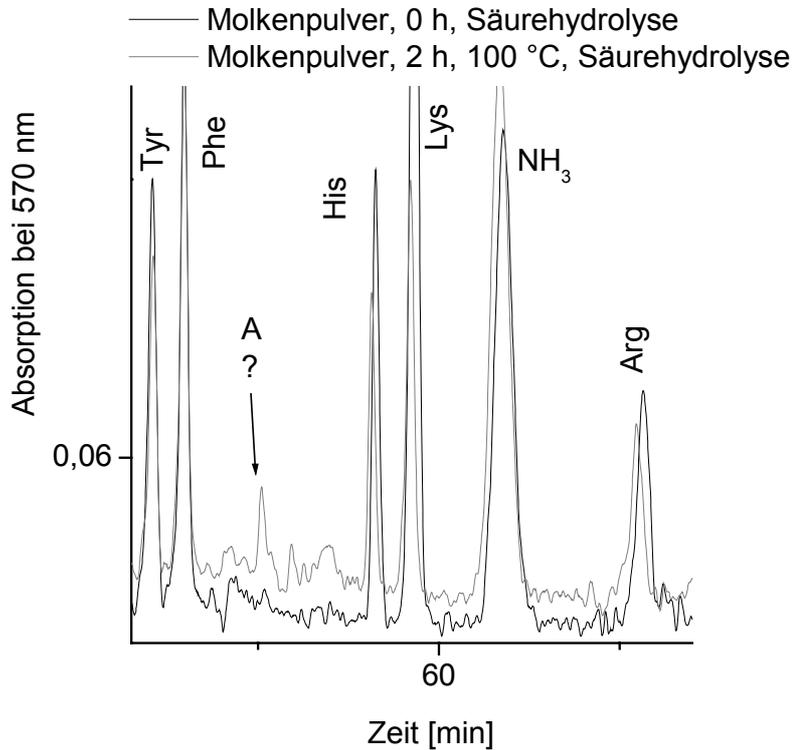


Abbildung 4.3.2.2-4: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von Säurehydrolysaten von Molkepulver (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) erhitzt für 0 h und 2 h bei 100 °C

Im Molkenpulver nach Säurehydrolyse kann keine eindeutige Bildung von PIO verzeichnet werden. Dagegen ist die Bildung von "A" messbar (vgl. 4.3.3.1). Vergleicht man Abb. 4.3.2.2-4 mit der in Abb. 4.3.2.1-2, **B** dargestellten Umsetzung von Casein mit 3,4-Didesoxypentosulose, so kann man feststellen, dass auch hier eine Bildung von PIO im unteren Konzentrationsbereich gemessen werden konnte, und dass "A" bevorzugt gebildet wurde.

Ausgehend von Ergebnissen der Studien an Modellsystemen aus Casein und Lactose bzw. Casein und 3,4-Didesoxypentosulose ist der Gesamtgehalt von proteingebundenem PIO in Lebensmitteln nach enzymatischer Hydrolyse wahrscheinlich nicht zu bestimmen. Andererseits ist PIO aufgrund seiner Säureinstabilität nach Säurehydrolyse ebenfalls nicht zu erfassen. Daher bietet sich die Möglichkeit, PIO nach Säurehydrolyse über seine Hydrolyseprodukte in Lebensmitteln zu bestimmen.

4.3.3 Säurehydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

4.3.3.1 Säurehydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Modellansätzen

Isoliertes PIO wurde einer Salzsäurehydrolyse (vgl. 3.3.1.1) unterzogen. Hierzu wurde die in 3.4.1.2 beschriebene Synthese von Boc-PIO vorgenommen. Es wurde hierbei keine Isolierung und Reinigung von Boc-PIO aus dem Syntheseansatz durchgeführt. Der Inkubationsansatz wurde nach der methanolischen Extraktion und Entfernung des Methanols am Rotationsverdampfer direkt zur Säurehydrolyse eingesetzt. Das dabei erhaltene Chromatogramm ist in Abbildung 4.3.3.1-1 dargestellt. Es sind drei Hydrolyseprodukte von PIO detektierbar, die mit A, B und C gekennzeichnet wurden.

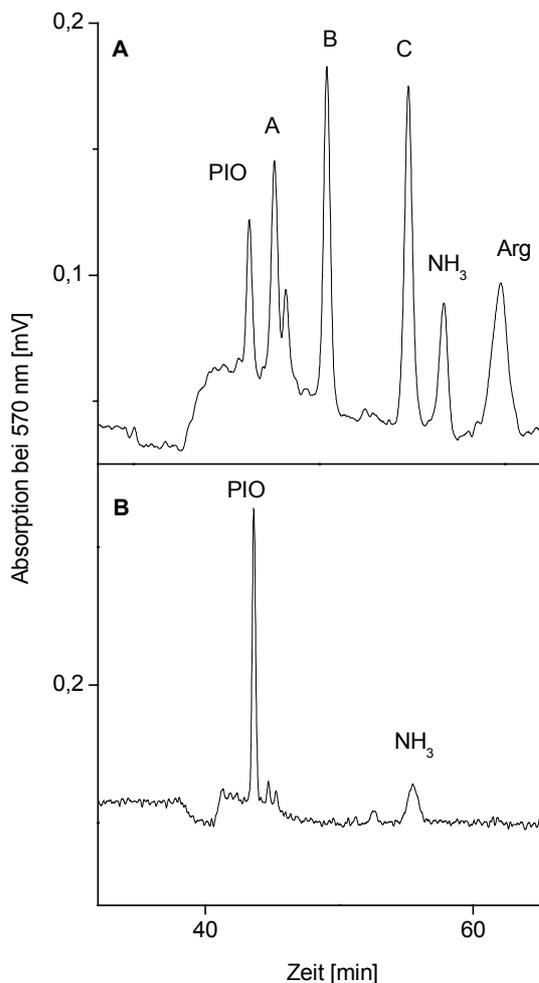


Abbildung 4.3.3.1-1: Ionenaustauschchromatographie mit der Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von Säurehydrolysaten von **A** Syntheseansatz von Boc-PIO und **B** PIO Standard (1 mmol/l)

4 Ergebnisse und Diskussion

Vergleicht man das Säurehydrolysat von PIO (Abb. 4.3.3.1-1) mit dem Chromatogramm eines Aminosäure-Standards, so kann man feststellen, dass Verbindung A vor Histidin und Verbindung C nach Lysin im Aminosäurechromatogramm eluieren. Verbindung B dagegen zeigt dieselbe Retentionszeit wie Lysin und kann wahrscheinlich nicht mit der hier verwendeten Trennmethode in Proteinhydrolysaten bestimmt werden. Nach der 23-stündigen Hydrolyse (6 N HCl, 110 °C) ist noch ein Rest von PIO nachweisbar.

Um das Verhalten einzelner Hydrolyseprodukte sowie von PIO zu untersuchen, wurde eine 1 mmolare Lösung von PIO in Wasser, in 2 N und 4 N HCl bei 110 °C für 0, 6, 12 und 24 h lang inkubiert und die Proben mittels Aminosäureanalyse untersucht (*Schuster et al., 2005*). Nach nur 6 h Inkubation von PIO in Wasser bei 110 °C konnte eine Abbaurate von PIO von 89 % verzeichnet werden. Der Gehalt blieb für weitere 18 h nahezu konstant. Gleichzeitig erfolgte die Bildung von Verbindungen B und C, deren Peakflächen bis zu 23 h stetig zunahmen. Nach der Hydrolyse von PIO mit 2 N HCl konnte ein ähnliches Produktspektrum beobachtet werden. Die Abbaurate von PIO in einer 4 N HCl war vergleichbar mit dem Abbau in 6 N HCl und betrug 80 %.

In einer weiteren Studie zum Verhalten von PIO bei der Säurehydrolyse wurden 10 ml des oben beschriebenen Syntheseansatzes von Boc-PIO (vgl. 3.4.1.2) in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, mit 10 ml einer 1 mmolaren Lösung von Valin (0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0) versetzt und mit 6 N HCl für 0, 4, 8, 12, 16, 20 und 23 h bei 110 °C hydrolysiert. Valin wurde als interner Standard verwendet, da es säurestabil ist.

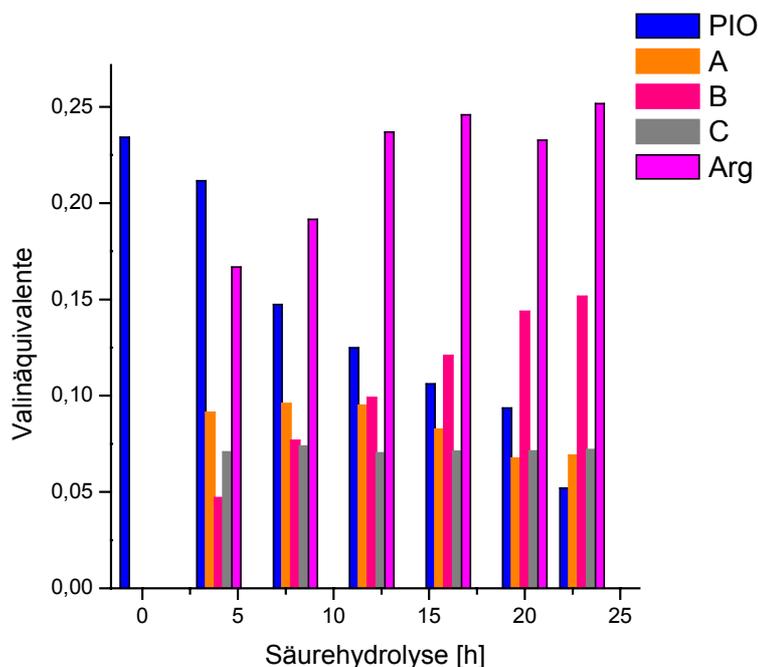


Abbildung 4.3.3.1-2: Säurehydrolyse von PIO-Syntheseansatz (6 N HCl, 110 °C) für 0, 4, 8, 12, 16, 20 und 23 h: PIO-Abbau und Bildung der Hydrolyseprodukte A, B und C und Arginin

In Abbildung 4.3.3.1-2 sind quantitative Daten nach Säurehydrolyse nach 4, 8, 12, 16, 20 und 23 h Hydrolyse dargestellt. Es ist ein kontinuierlicher Abbau von PIO und die Bildung von Hydrolyseprodukten zu erkennen.

Schon nach 4 h Hydrolyse kann die Bildung aller drei Hydrolyseprodukte sowie eine Rückbildung von Arginin verzeichnet werden. Die Bildung von Hydrolyseprodukt A findet bis zu 12 h Hydrolyse statt. Die Fläche des Hydrolyseproduktes B nimmt während der gesamten Säurehydrolyse zu. Das Hydrolyseprodukt C wird ebenfalls nach nur 4 h gebildet und verändert sich bis zum Ende der Hydrolyse kaum. Beobachtet werden kann, dass der Arginingehalt stetig zunimmt (*Rudolph et al., 2005*). Es deutet sich an, dass B ein stabiles und aus quantitativer Sicht wichtiges Produkt der Säurehydrolyse von PIO darstellt. Da während der Säurehydrolyse die Summe aller Peakflächen bzw. Valin-Äquivalente annähernd konstant bleibt, können die relativen Bildungsrate einzelner Hydrolyseprodukte prozentual berechnet werden. Somit ergibt sich für B eine Bildungsrate von 26 % nach 23 h Säurehydrolyse. A scheint säurelabil zu sein, und trägt wahrscheinlich zur Rückbildung von Arginin bei. Nach 12 h Hydrolyse wird PIO zu ca. 16 % zu A umgewandelt. Untersuchungen zur Bildung von PIO in Modellansätzen und Lebensmittelmodellen deuten darauf hin, dass A von Bedeutung sein könnte, da es in Lebensmitteln wahrscheinlich vorhanden ist. Das dritte Hydrolyseprodukt C scheint kein spezifisches Abbauprodukt von PIO zu sein, da sich sein Gehalt im Laufe der Hydrolyse nicht ändert. Es wird nicht kontinuierlich gebildet oder abgebaut, so dass sich hier die Frage stellt, ob C überhaupt aus dem Abbau von PIO stammt. Der prozentuale Anteil an C im gesamten Säurehydrolysat von PIO beträgt ca. 12 %.

4.3.3.2 Säurehydrolyse von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) in Lebensmitteln

Nachdem die Untersuchungen zum Hydrolyseverhalten von PIO in Modellsystemen gezeigt haben, dass PIO in drei verschiedene Abbauprodukte zerfällt, galt es, diese Verbindungen auch in Lebensmitteln nach einer Salzsäurehydrolyse zu identifizieren. Hierzu wurden verschiedene Milchproben bis zu 4 h bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt und anschließend einer Säurehydrolyse unterzogen. Nach der Bestimmung von Arginin und Abbauprodukten von PIO mittels Aminosäureanalyse konnten im Bereich zwischen Phenylalanin und Histidin im Aminosäurechromatogramm Signale von sehr geringer Intensität nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.3.2.2-4). Es zeigte sich als notwendig, die Proben so aufzuarbeiten, dass Hydrolyseprodukte von PIO und PIO selbst in genügender Konzentration vorliegen. Um dies zu erreichen, wurde in der zu untersuchenden Milchprobe zunächst das Casein durch Ansäuern mit 1 N HCl gefällt und von den restlichen Bestandteilen der Matrix abgetrennt. 10

mg des so gewonnenen Caseins wurden säurehydrolysiert und mittels Aminosäureanalyse auf Hydrolyseprodukte untersucht. In Abbildung 4.3.3.2-1 ist ein Aminosäurechromatogramm des Säurecaseins einer hitzebehandelten UHT-Milch bei 0 h, 2 h und 4 h bei 100 °C nach der Salzsäurehydrolyse dargestellt.

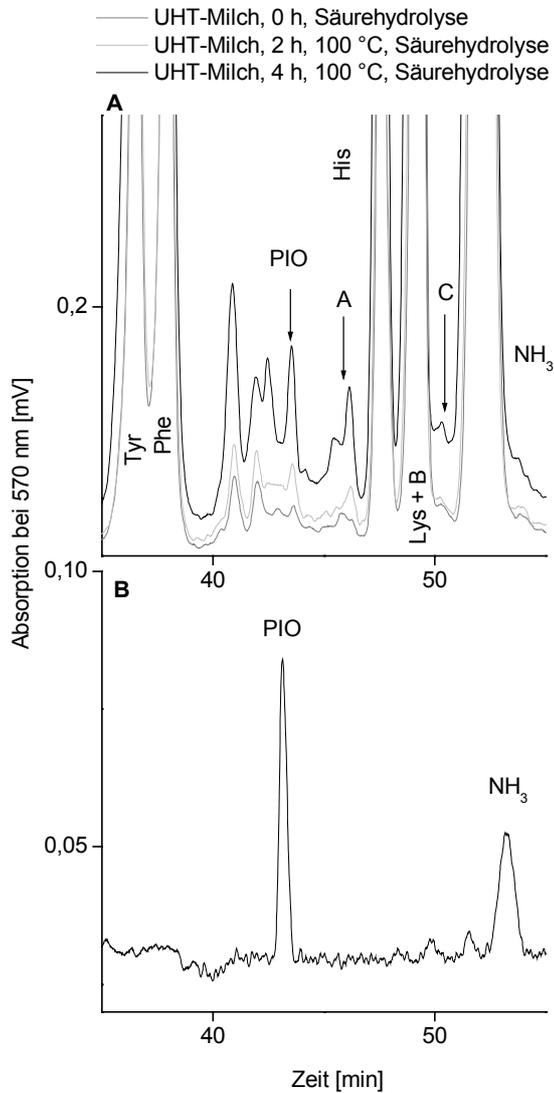


Abbildung 4.3.3.2-1: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von **A** Säurehydrolysaten von Säurecasein einer für 0 h, 2 h und 4 h bei 100 °C vorbehandelten UHT -Milch und **B** PIO-Standard (0,2 mmol/l)

Schon im Nullwert sind einige Signale mit vergleichbarer Retentionszeit wie PIO zu erkennen. Mit der Inkubationszeit stiegen die Peakflächen einzelner Signale an. Eindeutig zu erkennen, ist eine Zunahme der Fläche der Verbindung A und PIO. Bei der nach Lysin eluierenden Verbindung im Chromatogramm könnte es sich um Verbindung C handeln. Verbindung B koeluiert mit Lysin, so dass zu ihrer Bestimmung eine Optimierung der Trennung notwendig ist. Da Untersuchungen an Milchprodukten nach Säurehydrolyse gezeigt

haben, dass PIO und seine Hydrolyseprodukte in nicht zu vernachlässigbaren Mengen nachweisbar sind, wurden Versuche vorgenommen, Hydrolyseprodukte von PIO zu isolieren und ihre Struktur aufzuklären.

4.4 Isolierung von Hydrolyseprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

4.4.1 Präparative Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von Hydrolyseprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)

Die Isolierung einzelner Hydrolyseprodukte von PIO erfolgte mittels semi-präparativer Ionenaustauschchromatographie an einem stark sauren Kationenaustauscher (Na⁺-Form) nach der Säurehydrolyse des Boc-PIO-Syntheseansatzes (siehe 3.4.1.2 und 3.6). Das zur Trockene eingedampfte Säurehydrolysat von PIO wurde in 20 ml 0,1 N Citratpuffer, pH 3,15, gelöst und auf die Säule gegeben. Nach dem Waschen des Austauschers mit 0,1 N Citratpuffer pH 3,15 erfolgte die Fraktionierung der Probe mit 0,3 N Natriumcitratpuffer pH 5,15, indem 150 Fraktionen zu je 10 ml gesammelt und mittels Tüpfeltest (vgl. 3.3.3.3) auf die ninhydrinpositive Reaktion geprüft wurden. Für die ninhydrinpositive Fraktionen konnte nach dünnschichtchromatographischer Untersuchung an Kieselgel (vgl. 3.3.3.4) durch den Vergleich von R_F-Werten der Hydrolyseprodukte mit den zur Verfügung stehenden Standardsubstanzen (Arginin, Ornithin und PIO) festgestellt werden, dass PIO in den Fraktionen 19 bis 25 im Gemisch mit einer unbekanntem ninhydrinpositiven Verbindung mit einem R_F-Wert von 0,60 eluierte. In Fraktionen 50 bis 55 war eine Verbindung mit einem R_F-Wert von 0,67 enthalten. Der R_F-Wert von 0,67 stimmte mit dem R_F-Wert des Ornithins überein. Bei den restlichen Fraktionen konnte keine weitere ninhydrinpositive Verbindung nachgewiesen werden. Deshalb erfolgte eine Steigerung des pH-Wertes des Natriumcitratpuffers auf pH 6,15 und die Fraktionierung wurde fortgesetzt, wobei eine weitere ninhydrinpositive Verbindung in den Fraktionen von 190 bis 200 eluierte, die bei der DC einen R_F-Wert von 0,55 zeigte. Nachdem die einzelnen Fraktionen mittels Aminosäureanalyse untersucht wurden, konnte bestätigt werden, dass es sich bei der in Fraktionen 19 bis 25 enthaltenen Verbindung um das Hydrolyseprodukt A handelte. Fraktionen 50 bis 55 enthielten Verbindung B und Fraktionen 190 bis 200 Verbindung C. Da sich das Hydrolyseprodukt B chromatographisch rein isolieren ließ, wurden weitere Versuche zur Strukturaufklärung dieser Verbindung vorgenommen.

4.4.2 Strukturaufklärung von Abbauprodukten von N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxoimidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)*Aminosäureanalyse*

Fraktionen 50 bis 55 wurden vereinigt, bis zu einem Volumen von 5 bis 10 ml am Rotationsverdampfer eingengt und mittels Aminosäureanalyse nochmals untersucht (Abb. 4.4.2-1, C).

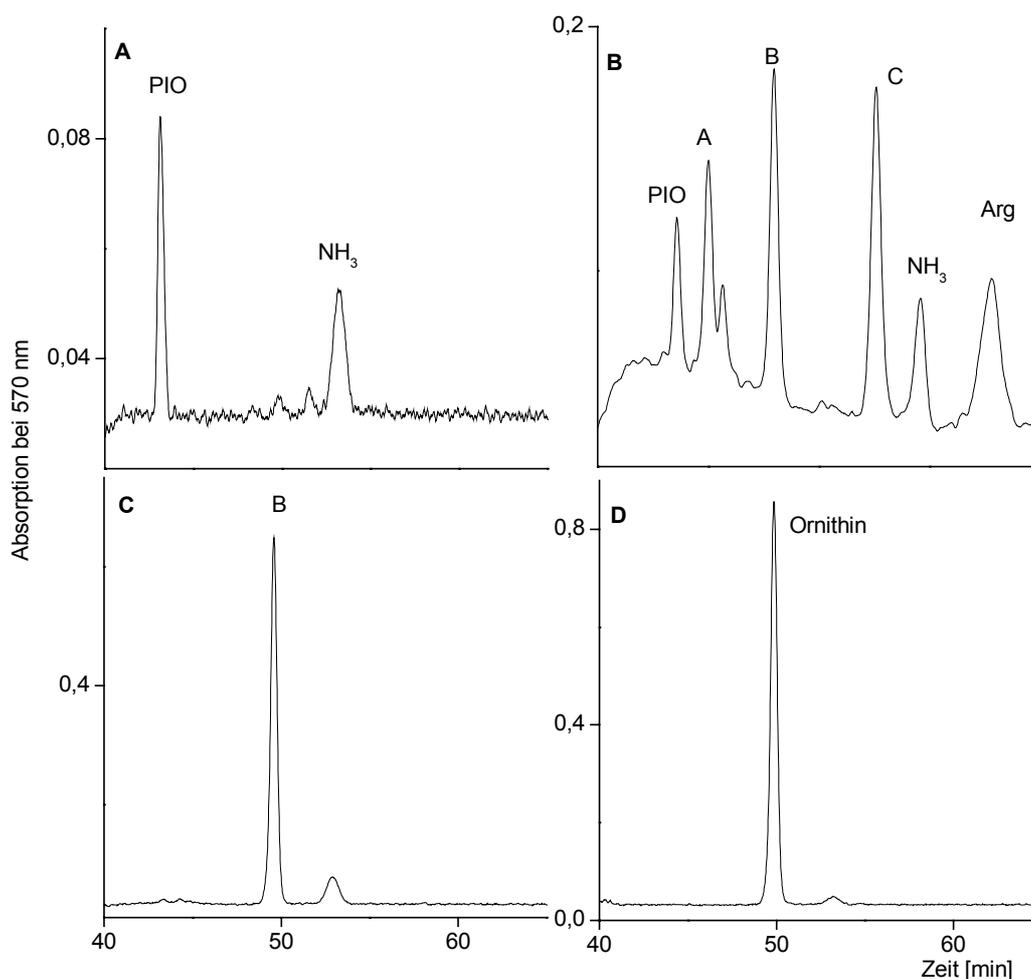


Abbildung 4.4.2-1: Ionenaustauschchromatographie mit Nachsäulenderivatisierung mittels Ninhydrin gemessen bei 570 nm von: **A** PIO Standard (0,2 mmol/l); **B** Säurehydrolysat des Syntheseansatzes von Boc-PIO; **C** Verbindung B nach der Fraktionierung mittels semi-präparativer Ionenaustauschchromatographie und **D** Ornithin Standard (1mmol/l)

Da die dünnschichtchromatographische Untersuchung eine Übereinstimmung von R_f -Werten von Verbindung B und Ornithin ergab, wurde eine 1 mmolare Lösung von Ornithin in Natriumcitratpuffer pH 2,2 zum Vergleich mittels Aminosäureanalyse untersucht. Wie in Abbildung 4.4.2-1 C und D dargestellt, zeigen Ornithin und Verbindung B im

Aminosäurechromatogramm dieselbe Retentionszeit. Nach Zudotierung einer 1 mmolaren Ornithin-Lösung zu der isolierten Verbindung B konnte gezeigt werden, dass die Fläche der Verbindung B entsprechend der zugesetzten Lösung an Ornithin zunahm.

Gaschromatographie-Flammenionisationsdetektion (GC-FID)

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von Aminosäuren nach entsprechender Derivatisierung ist durch die Probenaufarbeitung mittels EZ:faast Methode gegeben (vgl. 3.3.7.2). Die Proben werden dann einer gaschromatographischen Messung mit der Flammenionisationsdetektion unterzogen. Mit dieser Methode ist die Bestimmung von Arginin nicht möglich, da die Guanidinogruppe des Arginins zu basisch ist, um derivatisiert werden zu können. Die Derivatisierung wird mit Propylchlorformiat vorgenommen. Sie findet statt sowohl an der Carboxyl- als auch an der freien Aminogruppe der Aminosäuren wie in Abbildung 4.4.2-2 dargestellt.

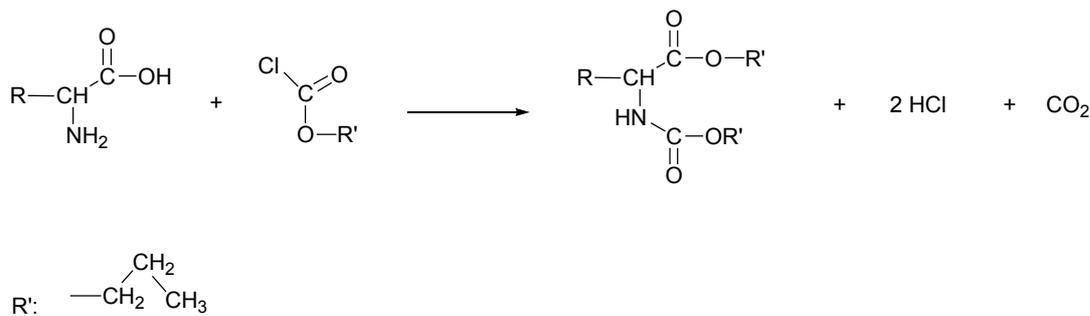


Abbildung 4.4.2-2: Derivatisierung von Aminosäuren mittels Propylchlorformiat zur Bestimmung mittels Gaschromatographie mit der Flammenionisationsdetektion (Hušek, 1991)

100 µl des Isolates der Verbindung B in Natriumcitratpuffer, pH 5,15, wurden wie in 3.3.7.2 beschrieben derivatisiert und 2,5 µl der so vorbereiteten Probe zur gaschromatographischen Untersuchung gegeben. Als Vergleich wurden 100 µl einer 1 mmolaren Lösung von Ornithin in Natriumcitratpuffer, pH 5,15, derivatisiert und mit GC-FID untersucht. Als interner Standard wurde Norvalin verwendet. Ornithin sowie B zeigten jeweils ein Signal im Gaschromatogramm bei 4,3 min Retentionszeit. Analog zu Aminosäureanalyse wurde auch hier B mit 0,5 mmol/ l Ornithin Standardlösung vor der Derivatisierung zudotiert und auf Ornithin untersucht. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die Peakfläche der mit Ornithin zudotierten Verbindung B zunahm.

ESI-TOF-MS

Den eindeutigen Nachweis zur Identität von Verbindung B lieferte die ESI-TOF-MS Messung. Hierzu muss die zu untersuchende Verbindung in salzfreier Form vorliegen. Die Entsalzung wurde wie in 3.3.3.2 beschrieben am stark sauren Kationenaustauscher in der H^+ -Form vorgenommen. Die bei der ESI-TOF-MS Messung ermittelten Massezahlen m/z gemessen als $[MH]^+$ sind in Abbildung 4.4.2-3 dargestellt. Als Vergleich wurde eine 1 mmolare Lösung von Ornithin in Methanol:Wasser (50:50, v/v) gemessen (Abb. 4.4.2-3, A). Die für Ornithin erwartete Massezahl m/z von 133,0 als $[MH]^+$ wurde bestätigt. In Abb. 4.4.2-3 B ist das aufgenommene Massenspektrum des isolierten Abbauproduktes von PIO zu sehen. Wie aus den Massenspektren (Abb. 4.4.2-3) erkennbar, stimmen die ermittelten Massezahlen für Ornithin und Verbindung B überein, so dass man zweifelsfrei sagen kann, dass es sich bei der isolierten Verbindung B um Ornithin handelt.

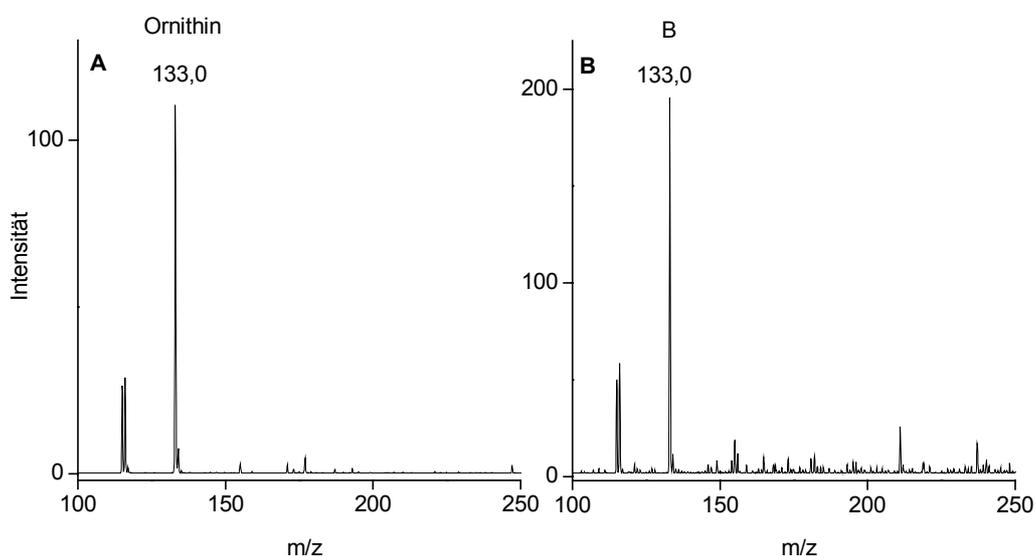


Abbildung 4.4.2-3: ESI-TOF-MS gemessen im positiven Messmodus als $[MH]^+$ von A Ornithin Standard (1 mmol/l) und B der aus dem PIO Syntheseansatz mittels semi-präparativer Ionenaustauschchromatographie isolierten Verbindung B

4.4.3 Bedeutung und Bildung von Ornithin *in vivo* und während der Maillard-Reaktion

Ornithin (Abb. 4.4.3-1, **75**) ist eine nicht-essentielle, nicht-proteinogene, basische Aminosäure, die entweder über die Nahrung aufgenommen werden kann, oder *in vivo* über zwei verschiedene Wege gebildet wird (Höche, 2004). Zum einen entsteht Ornithin im Harnstoffzyklus vor allem in der Leber über die Arginase-Reaktion, wobei aus L-Arginin (**73**) Harnstoff (**74**) und Ornithin (**75**) entstehen (Höche, 2004; Sell & Monnier, 2004; Arena et al., 2002). Andererseits dient Arginin als Substrat für die Stickstoffmonoxid-Synthase, wobei

Stickstoffmonoxid und L-Citrullin (**76**) gebildet werden. Arginin und Citrullin stellen eine potentielle Energiequelle für Milchsäurebakterien dar (Arena *et al.*, 2002). Das *in vivo* gebildete Ornithin dient als Ausgangsverbindung für die Polyaminsynthese, wie z. B. für Spermin, Spermidin oder Putrescin.

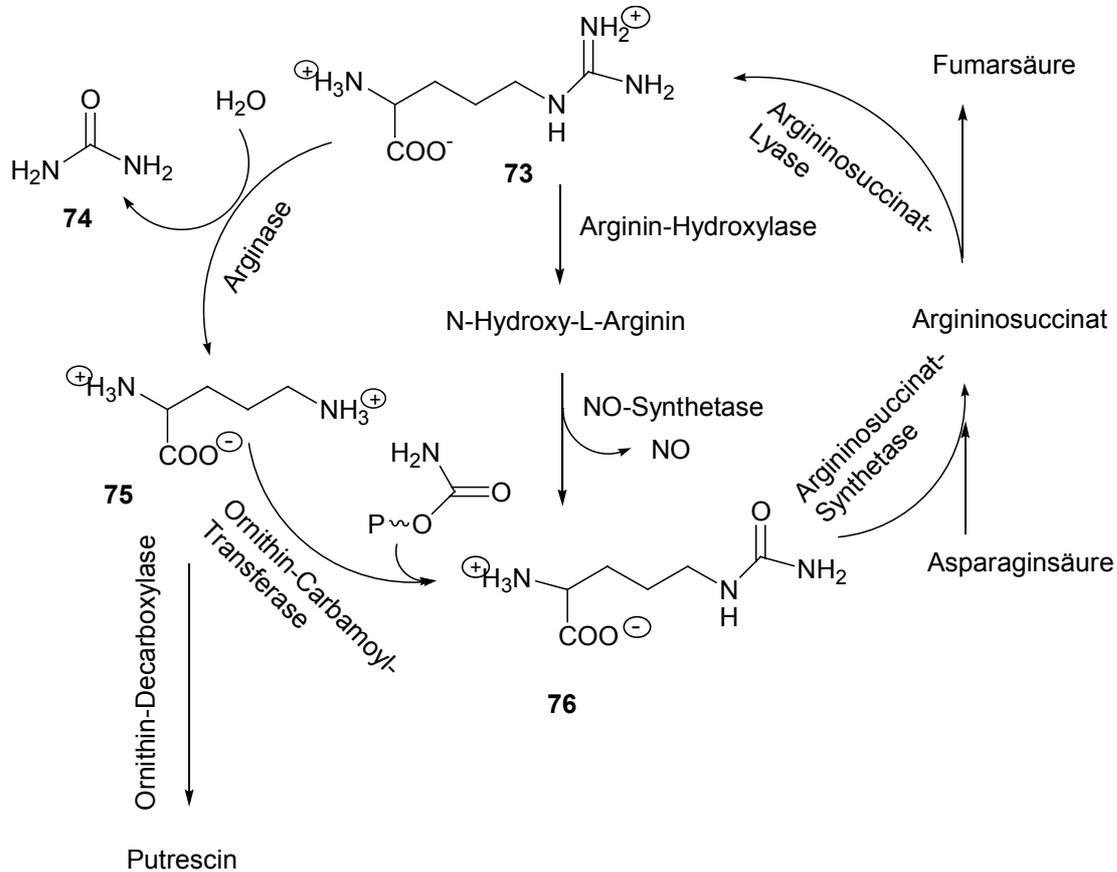


Abbildung 4.4.3-1: Bildung von Ornithin (**75**) aus L-Arginin (**73**) durch die Einwirkung von Arginase und Abspaltung von Harnstoff (**74**) und L-Citrullin (**76**) aus Ornithin durch die Einwirkung von Ornithin-Carbamoyl-Transferase und aus L-Arginin über N-Hydroxy-L-Arginin und Bildung von Stickstoffmonoxid

In Lebensmitteln vorkommendes Arginin kann durch verschiedene Bakterienstämme wie z. B. *Lactococcus lactis* in Käse, *Lactobacillus plantarum* in Fisch oder *Lactobacillus sake* in Fleisch enzymatisch abgebaut werden (Arena *et al.*, 2002). Das hierbei gebildete Ornithin kann durch die Ornithin-Decarboxylase zu Putrescin umgewandelt werden, was zum Verderb des Lebensmittels führt.

Eine Identifizierung von Ornithin als Produkt der Maillard-Reaktion erfolgte vor kurzem erstmals von Sell & Monnier (2004). Ornithin wird dabei nicht als ein primäres Produkt der Maillard-Reaktion, sondern als ein Produkt der Folgereaktionen von Arginin-AGEs angesehen. Zusätzlich wird während der Säurehydrolyse ein Teil des Ornithins direkt aus Arginin gebildet. Sell & Monnier (2004) gelang es, Ornithin als ein Abbauprodukt von

Argpyrimidin (47) und der Crosslink-Aminosäuren Pentosidin (53), Glucosepan (56), MODIC (55), GODIC (54) und DOGDIC (57) (vgl. 2.3.2 und 2.3.3) zu identifizieren. Die Autoren wiesen nach, dass die Bildung von Ornithin *in vivo* mit zunehmendem Alter verstärkt stattfindet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, Ornithin als ein Haupthydrolyseprodukt von PIO zu identifizieren. In Hydrolysestudien konnte eine konstante Umsetzung von PIO zu Ornithin verzeichnet werden. Sie betrug 26 % nach 23 h Säurehydrolyse mit 6 N HCl bei 110 °C (vgl. 4.3.3.1). Verglichen mit den von *Sell & Monnier (2004)* erzielten Ergebnissen (Tabelle 4.4.3-1) liegt die hier abgeschätzte Umsetzungsrate im vergleichbaren Bereich. Man kann davon ausgehen, dass der größte Teil des in disaccharidhaltigen Lebensmitteln nach Säurehydrolyse messbaren Ornithins aus dem Abbau von PIO oder anderen Imidazolinon-Derivaten stammt. Die "direkte" Bildung von Ornithin aus Arginin während der Säurehydrolyse wurde hierzu im Vergleich ebenfalls bestimmt. Dazu wurde eine 1 mmolare Lösung von Arginin gelöst in Reinstwasser einer Salzsäurehydrolyse unterzogen und auf den Ornithingehalt mittels Aminosäureanalyse geprüft. Es konnte festgestellt werden, dass reines Arginin nur zu einem unwesentlichen Teil (0,02 %) zu Ornithin umgesetzt wurde (*Schuster et al., 2005*). Arginin als Quelle für die Ornithinbildung auf nicht-enzymatischem Weg kann somit vernachlässigt werden.

Tabelle 4.4.3-1: Bildung von Ornithin während der Salzsäurehydrolyse für 16 h bei 110 °C aus AGEs (*Sell & Monnier, 2004*) sowie die in Haut und Augenlinsenprotein ermittelten Gehalte an Ornithin in pmol/ mg Protein

	gebildetes Ornithin [%]	Ornithin <i>in vivo</i> [pmol/ mg]	
		Haut	Augenlinsenprotein
Argpyrimidin	13,2 ± 4,4	22	40
Pentosidin	15,8 ± 7,3	9	0,95
Glucosepan	1,14 ± 0,42	16	3
MODIC	0,22 ± 0,02	0,04	-
GODIC	0,34 ± 0,06	0,03	0,01
DOGDIC	0,51 ± 0,12	0,02	-

Die von *Sell & Monnier (2005)* bestimmten Werte für Ornithin in Haut- und Augenlinsenprotein wurden umgerechnet ausgehend von den Ausgangsgehalten einzelner in Tabelle 4.4.3-1 aufgeführten Verbindungen in Kollagen bzw. in Augenlinsenprotein (vgl. 2.3.5).

Um den Bildungsmechanismus von Ornithin aus Arginin-AGEs und PIO in Abhängigkeit von der bei der Reaktion beteiligten Kohlenhydratkomponente zu untersuchen, wurden

Modellansätze aus Casein, Casein und Lactose (molares Verhältnis 1:30) und Casein und Glucose (molares Verhältnis 1:30) bis zu 24 h lang bei 100 °C erhitzt, enzymatisch bzw. säurehydrolysiert (vgl. 3.6.2) und nach der Derivatisierung mit Hilfe des EZ:faast Kits (vgl. 3.3.7.2 und 3.6.3) mittels GC-MS untersucht (vgl. 3.3.6.3). Als interner Standard wurde Norvalin verwendet. Im Gaschromatogramm eluiert Ornithin bei 36,6 min und Norvalin bei 21,5 min Retentionszeit. Die für Ornithin und Norvalin ermittelten Massezahlen m/z sind Kapitel 3.3.6.3 zu entnehmen. Wie schon bei *Sell & Monnier (2004)* beschrieben, konnte in Inkubationsansätzen nach enzymatischer Hydrolyse keine Zunahme an Ornithin verzeichnet werden. Dagegen ist eine eindeutige Bildung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit sowie von der Kohlenhydratkomponente nach Säurehydrolyse zu erkennen (Abb. 4.4.3.2). Dies deutet darauf hin, dass Ornithin ein spezifisches Folgeprodukt der Säurehydrolyse von Arginin-Derivaten der Maillard-Reaktion darstellt. In Inkubationsansätzen von reinem Casein ist auch nach 24 h Erhitzung bei 100 °C keine bedeutende Zunahme des Ornithin-Gehaltes zu verzeichnen. Es zeigte sich, dass eine verstärkte Bildung in Ansätzen von Casein mit Glucose innerhalb von 4 h stattfindet und etwas höher liegt als bei den Ansätzen mit Lactose. Bei längerer Erhitzung kommt es jedoch vermutlich aufgrund von Folgereaktionen (Reaktion von Ornithin mit Glucose?) zu einer Abnahme des Ornithin-Gehaltes. Die Bildung von Ornithin in lactosehaltigen Caseinmodellen steigt dagegen bis zu 24 h Inkubation kontinuierlich an und erreicht ca. das Dreifache des Ornithin-Gehaltes der glucosehaltigen Proben.

Diese Untersuchung hat eindeutig gezeigt, dass Ornithin ein direktes Produkt der Säurehydrolyse ist, und dass seine Bildung in Abhängigkeit von dem an der Reaktion beteiligten Kohlenhydrat stattfindet. Die Tatsache, dass in glucosehaltigen Caseinmodellen Ornithin zu bestimmen ist, weist auf die Bildung von säurelabilen Argininderivaten hin, die aus der Reaktion mit 3-Desoxyglucosulose, Glyoxal oder Methylglyoxal resultieren (vgl. 2.3.2). Argpyrimidin (Abb. 2.3.2-1, **47**), das Reaktionsprodukt von Arginin mit Methylglyoxal, reagiert nach *Sell & Monnier (2005)* während der Säurehydrolyse zu ca. 13 % zu Ornithin (Tabelle 4.4.3-1). Eine weitere Quelle der Ornithin Bildung könnte das N- δ -(5-Methyl-4-oxo-5-hydroimidazol-2-yl)-L-ornithin (Abb. 2.3.2-1, **46**), ein weiteres Reaktionsprodukt aus Arginin und Methylglyoxal, darstellen. Dies müsste jedoch in weiteren Studien geprüft werden.

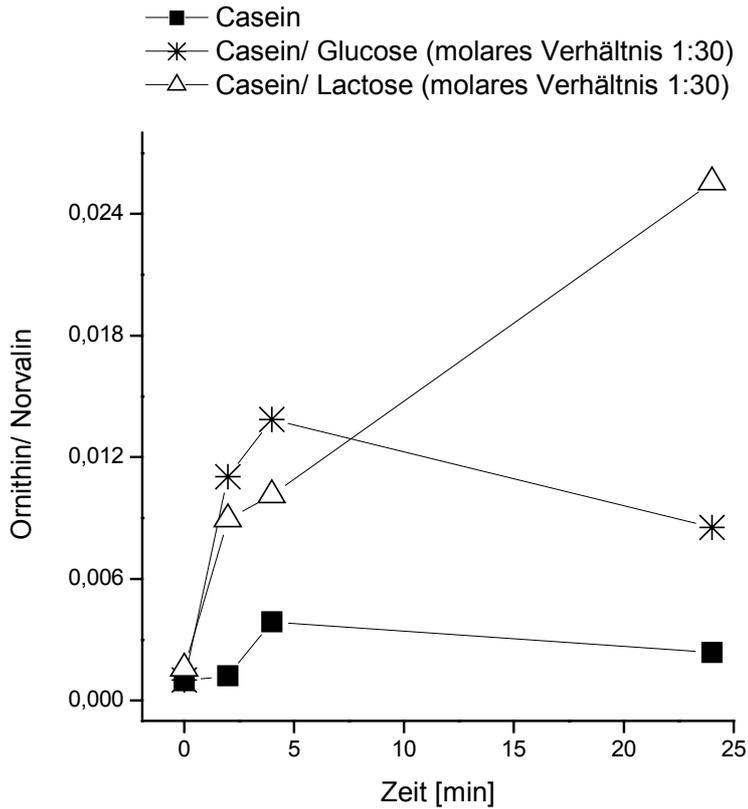


Abbildung 4.4.3.2: Bildung von Ornithin in Säurehydrolysaten der Modellansätze aus Casein, Casein und Glucose (molares Verhältnis 1:30) und Casein und Lactose (molares Verhältnis 1:30) nach 0, 2, 4 und 24 h Inkubation bei 100 °C

Da die Untersuchung zum Hydrolyseverhalten von PIO ergeben hat, dass PIO während der Salzsäurehydrolyse zu 26 % zu Ornithin reagiert (vgl. 4.3.3.1), könnte nach 24 h Inkubation von Casein und Lactose (molares Verhältnis 1:30) der Gehalt von PIO ermittelt werden. Durch Vergleich mit Ornithin-Standardlösungen konnte der Ornithingehalt abgeschätzt werden (vgl. Tab. 4.4.3-2). Wie der Tabelle 4.4.3-2 zu entnehmen, entstehen 39,5 μmol Ornithin/ g Casein nach 24 h Inkubation von Casein und Lactose. Geht man davon aus, dass 26 % des Ornithins von PIO stammen, würde dies bedeuten, dass in diesen Ansätzen etwa 152 μmol PIO/ g Casein vor der Hydrolyse vorhanden waren.

Tabelle 4.4.3-2: Abschätzung der Ornithin- und PIO-Gehalte [$\mu\text{mol/ g Casein}$] in Caseinmodellen (Casein/Lactose, molares Verhältnis 1:30) und der Argininderivatisierung

Inkubationszeit [h]	Ornithin [$\mu\text{mol/ g Casein}$]	PIO [$\mu\text{mol/ g Casein}$]	Derivatisierung von Arginin [%]
0	3,7	14,2	6,0
2	14,7	56,5	24,0
4	16,5	63,5	27,0
24	39,5	151,9	64,6

Die Abschätzung der Bildung von PIO in Casein/Lactose-Modellansätzen (molares Verhältnis 1:30) während der Hitzebehandlung bei 100 °C und die entsprechende Derivatisierung von Arginin sind der Tabelle 4.4.3-2 zu entnehmen. Geht man davon aus, dass 4,1 g Arginin/ 100 g Casein (entspricht 236 µmol/ g Casein) vorhanden sind (*Belitz et al., 2001*), so entsprechen die nach 24 h Erhitzung gebildeten 152 µmol PIO/ g Casein einer Argininderivatisierung von ca. 65 %. Nach 24 h Erhitzung ist mittels ASA kein Arginin mehr detektierbar. Schlussfolgernd ist, dass der größte Teil des proteingebundenen Arginins im Casein gezielt zu PIO reagiert.

Über das Vorkommen und Gehalte an Ornithin in Lebensmitteln ist bislang wenig bekannt. Als nicht-proteinogene Aminosäure wurde Ornithin in Lebensmitteln mittels GC-FID bestimmt. *Silva et al. (2004)* untersuchten Quitten aus verschiedenen Regionen sowie Fruchtaufstriche auf ihren Aminosäuregehalt, wobei ein sehr geringer Ornithingehalt von 2,1 µg/ kg Fruchtbrei, 2,7 µg/ kg Fruchtschale und 1,5 µg/ kg im Fruchtaufstrich bestimmt werden konnte. Im Durchschnitt konnten keine bedeutenden Unterschiede zwischen dem Ornithingehalt in der frischen Frucht und im zubereiteten Fruchtaufstrich nachgewiesen werden. Da hier keine Angabe über den Arginingehalt gemacht wurde, und der Ornithingehalt relativ konstant zu sein scheint, dürfte in dieser Untersuchung die Argininderivatisierung und der sich daraus ableitende Abbau von AGEs zu Ornithin keine Rolle spielen. Dagegen fanden *Taborda et al. (2003)* in verschiedenen spanischen Käsesorten Gehalte von 3,0 bis 24,5 mg Ornithin/ kg. Diese wesentlich höheren Gehalte an Ornithin beruhen zum Teil auf der Aktivität von Milchsäurebakterien, die Arginin zu Ornithin und Citrullin umsetzen. Andererseits ist es ausgehend von unseren und von den Studien von *Sell & Monnier (2004)* zu erwarten, dass ein Teil des Ornithins aus dem spontanen Abbau der während der Käseherstellung entstehenden AGEs des Arginins stammt. Dies muss in weiteren Studien geprüft werden, etwa indem Ornithingehalte in verschiedenen Milch- und Käseproben vor und nach der Säurehydrolyse bestimmt werden.

4.5 Bestimmung von Carbonylverbindungen in Lebensmitteln

Mit der Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in verschiedenen Lebensmitteln haben sich bisher nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigt. Carbonylverbindungen entstehen als sehr reaktive Intermediate des Zuckerabbaus (vgl. 2.1.2) und sind in der Lage, mit freien Aminogruppen der Proteinseitenketten zu reagieren und somit die Proteinstruktur zu verändern (vgl. 2.3.2). Aufgrund der hohen Reaktivität dieser Zuckerabbauprodukte sind keine hohen Gehalte in Lebensmitteln zu erwarten. Andererseits ist es bekannt, dass in Plasma

und Urin von Diabetes- und Urämiepatienten erhöhte Mengen an α -Dicarbonylverbindungen auftreten. Glyoxal und Methylglyoxal wirken in Modell- und Tierversuchen cytotoxisch und antibakteriell (Wieslander et al., 1995a). Methylglyoxal wurde als mutagen gegen *Salmonella typhimurium* TA100 und TA104 sowie gegen *E. coli* WP2 uvrA (Nagao et al., 1986) eingestuft. Seine Mutagenität wurde auch im Kaffee nachgewiesen, wo 50 % des Gesamtmutagenpotentials auf Methylglyoxal zurückzuführen ist (Kasai et al., 1982).

Jedoch ist die Frage, wie 1,2-Dicarbonylverbindungen nach der Zufuhr durch die Nahrung resorbiert und verstoffwechselt werden, ungenügend geklärt. Meistens wird die Bildung von Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln wie z.B. Wein, Joghurt, Butter oder Essig im Zusammenhang mit Fermentationsprozessen diskutiert. Diacetyl und 2,3-Pentandion entstehen während der Fermentationsprozessen in alkoholischen Getränken oder diätetischen Produkten (Yamaguchi et al., 1994). Der Gehalt an Carbonylverbindungen kann als einer der Parameter für die Qualitätskontrolle solcher Lebensmittel herangezogen werden. Der andere Aspekt, der in Betracht gezogen werden muss, ist die Toxizität, die von diesen Verbindungen möglicherweise ausgeht, sowie ihre Auswirkungen *in vivo* (vgl. 2.1.3.1 und 2.1.3.2).

Aus verschiedenen Untersuchungen zum Abbau von Kohlenhydraten während der Hitzebehandlung, sowie aus der Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in Modellansätzen ergab sich die Frage, ob die Zuckerabbauprodukte in Lebensmitteln mit den schon etablierten Messmethoden analog zu den Modellansätzen bestimmt werden können.

4.5.1 Bestimmung von 3-Desoxypentulose in Milchprodukten

Eine Bestimmung von 3-Desoxypentulose (3-DP) in verschiedenen käuflich erworbenen Milchprodukten erfolgte mittels GC-MS nach Silylierung zu Trimethylsilyl (TMS)-Derivaten (vgl. 3.3.6.1). Die Probenaufarbeitung wurde wie in 3.3.6.2 beschrieben durchgeführt. Es erfolgte eine Kalibrierung unter Verwendung des internen Standards α -D-Galaktopyranosid, welches bei 13 min Retentionszeit im GC-Chromatogramm eluierte. Der 3-DP-TMS Standard eluiert bei 7,8 min und 9,6 min Retentionszeit in zwei isomeren Formen, der cyclischen und der offenkettigen Form (Abb. 4.2.1.2-1). Die Kalibriergerade für 3-Desoxypentulose als Summe beider Isomere ist Kapitel 8.2.1 zu entnehmen. Einzelne Milchproben wurden unbehandelt und bis zu 6 h bei 100 °C und 120 °C erhitzt nach der Derivatisierung auf den Gehalt von 3-Desoxypentulose untersucht. In Abb. 4.5.1-1 ist das Chromatogramm einer Vollmilch, die 0 h, 2 h und 6 h lang bei 120 °C inkubiert wurde, dargestellt. Aus der Abbildung ist zu erkennen, dass mit der zunehmenden Erhitzungsdauer auch der Gehalt an 3-Desoxypentulose zunimmt. In der Nullstundenprobe ist die offenkettige Form der 3-

Desoxyentulose (3-DP₁) nicht nachweisbar, aber das cyclische Isomer (3-DP₂) kann detektiert werden und wurde zu 3 mg/ l bestimmt. Die Messung erfolgte im selected ion monitoring (SIM) Modus mit den für 3-Desoxyentulose ermittelten Massezahlen.

Vergleicht man das Chromatogramm der unbehandelten Kondensmilchprobe (Abb. 4.5.1-2) mit dem Chromatogramm einer nicht behandelten UHT-Milch (Abb. 4.5.1-1), so stellt man fest, dass 3-Desoxyentulose in der Kondensmilch eindeutig identifizierbar und mit dem Gehalt der für 2 h bei 120 °C erhitzten Milchprobe vergleichbar ist. Anhand von Chromatogrammen sowie von den in Tabelle 4.5.1-1 dargestellten Gehalten an 3-Desoxyentulose als Summe beider Isomere können Aussagen über die Hitzebehandlung von Milch und Milchprodukten getroffen werden.

In beiden Abbildungen sind weitere der 3-Desoxyentulose nicht zuzuordnende Signale, mit gleichen Massezahlen m/z wie die 3-Desoxyentulose zu sehen. Hierbei handelt es sich um weitere in Milch vorhandene Minorzucker, wahrscheinlich Pentosen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden. Der Nachteil der Silylierung als Derivatisierungsmethode für Kohlenhydrate ist die Ausbildung mehrerer isomeren Formen, womit auch mehrere Signale im Chromatogramm erhalten werden, so dass eine Auswertung von unbekanntem Verbindungen dadurch sehr erschwert ist.

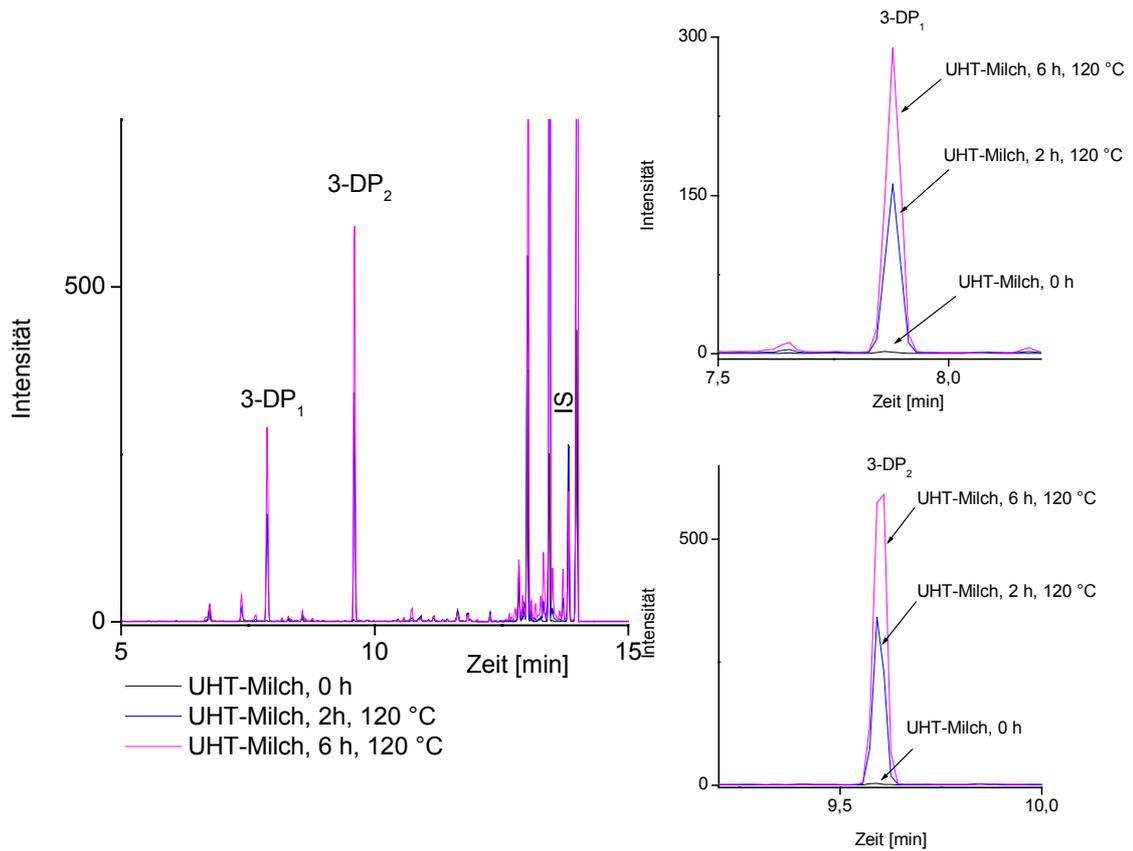


Abbildung 4.5.1-1: Gaschromatogramm einer UHT-Milch nach der Syllierung, gemessen mittels GC-MS im SIM Modus (3-DP₁- offenkettige Form; 3-DP₂-Furanose-Form)

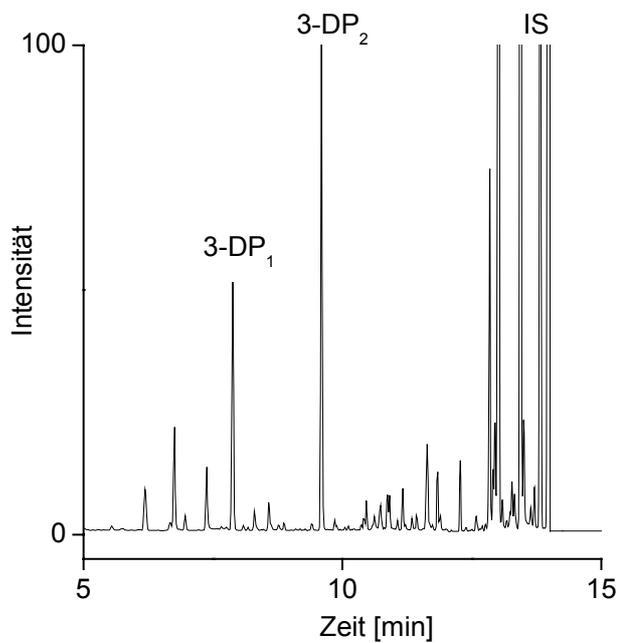


Abbildung 4.5.1-2: Gaschromatogramm einer Kondensmilch nach der Syllierung, gemessen mittels GC-MS im SIM Modus (Gehalt an 3-DP als Summe beider Isomere 62 mg/ l)

Tabelle 4.5.1-1: 3-Desoxypentulose in unbehandelten und hitzebehandelten Milchproben

Probe	3-DP-Gehalt [mg/l]
UHT-Vollmilch, 0 h	32
UHT-Vollmilch, 1h, 120 °C	194
UHT-Vollmilch, 2 h, 120 °C	238
Fettarme UHT-Milch, 0 h	3
Fettarme UHT-Milch, 2 h, 100 °C	16
Fettarme UHT-Milch, 4 h, 100 °C	103
Fettarme UHT-Milch, 6 h, 100 °C	163
Kondensmilch, 0 h	62
Kondensmilch, 2 h, 100 °C	115
Kondensmilch, 4 h, 100 °C	243
Kondensmilch, 6 h, 100 °C	268

Im Laufe der Erhitzung nimmt der Gehalt an 3-Desoxypentulose kontinuierlich zu. Es können deutliche Unterschiede im Gehalt an 3-DP festgestellt werden in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. In pasteurisierter Milch konnte keine 3-Desoxypentulose nachgewiesen werden (Gehalt < 3 mg/ l). Eine 2 h lang bei 120 °C erhitzte H-Vollmilch hat einen 14-fach höheren Gehalt an 3-DP als eine fettarme H-Milch, die 2 h lang bei 100 °C erhitzt worden ist. Zu ähnlichen Ergebnissen sind auch *Troyano et al. (1992, 1994, 1996)* gekommen. Die Autoren fanden nach der Erhitzung einer Milchprobe bei 120 °C für 20 min 250 mg 3-DP/ l Milch, was vergleichbar ist mit den in der Tabelle 4.5.1-1 aufgeführten Werten.

Unter Bedingungen der alkalischen Synthese von 3-Desoxypentulose (vgl. 3.4.2.1) konnten 26 mg 3-DP aus 20 g Lactose isoliert werden. Geht man davon aus, dass eine Kuhmilch 4-6 % Lactose enthält, würde dies bedeuten, dass 52-78 mg 3-Desoxypentulose/ l Milch auf diesem Weg entstehen können. Schaut man sich die Ergebnisse in der Tabelle 4.5.1-1 an, ist eine gewisse Übereinstimmung der berechneten und gefundenen Gehalte an 3-Desoxypentulose in einer unbehandelten Milch ersichtlich.

Wie in 4.2.1.2 dargestellt, wird aus 3-Desoxypentulose bei einer Hitzebehandlung 3-Desoxypentulosulose gebildet, welche ein weiteres aus dem Disaccharidabbau stammendes Kohlenhydrat darstellt (vgl. 2.2.2.2). Da diese Beobachtung in der Literatur bisher noch nicht beschrieben ist, müsste geprüft werden, inwieweit der Abbau von 3-Desoxypentulose zu 3-Desoxypentulosulose stattfindet, und ob in der pasteurisierten oder UHT- erhitzten Milch eher 3-Desoxypentulosulose nachzuweisen ist. Es ist wahrscheinlich, dass bei niedrigeren Temperaturen die Bildung von 3-Desoxypentulose langsam verläuft, sie weiter zu 3-

Desoxypentosulose reagiert, und somit in pasteurisierter bzw. UHT- erhitzter Milch nicht bzw. nur in geringen Mengen nachweisbar ist. Aus diesem Grund ist es *Troyano et al. (1992, 1994)* wahrscheinlich nicht gelungen in pasteurisierten Milchproben die 3-Desoxypentulose nachzuweisen. Daher wäre es von Bedeutung, den Gehalt an 3-Desoxypentulose in verschiedenen Milchproben zu bestimmen, um Aufschluss darüber zu bekommen, ob anhand von Gehalten an 3-Desoxypentulose und 3-Desoxypentosulose auf unterschiedliche Hitzebehandlung von Milch geschlossen werden kann.

4.5.2 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milch und Milchprodukten

4.5.2.1 Ermittlung statistischer Größen

Zur Ermittlung der Kalibriergerade von 1,2-Dicarbonylverbindungen wurden Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentulose wie in Tabelle 3.7.1-1 zu einer Stammlösung gemischt, die entsprechend der Tabelle 3.1.7-2 verdünnt wurde. Die so ermittelten Kalibriergeraden sind Kapitel 8.2.1.1 zu entnehmen. Eine Matrixkalibrierung wurde an einer Rohmilch vorgenommen, der die in Tabelle 3.7.1-3 aufgeführten Volumina an Stammlösung zudosiert wurden. Es stellte sich heraus, dass eine direkte Bestimmung von Carbonylverbindungen nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin in Milchproben nicht möglich ist. Es musste eine Probenaufarbeitung vorgenommen werden, um Fette und Proteine aus der Probe zu entfernen. Da es sich die Fällung mittels Methanol bei der Bestimmung von 3-Desoxypentulose in Milch als geeignete Fällungsmethode gezeigt hatte (vgl. 4.5.1), wurde sie auch für die Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen weiter verwendet (*Rättich et al., 2004*). Somit erfolgte die Matrixkalibrierung, indem 2 ml Rohmilch mit Stammlösung gemischt, mit Methanol auf 10 ml aufgefüllt und 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen wurde. Nach der Filtration wurden dann 2 ml zur Trockene eingengt und in 1 ml 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0, wieder aufgenommen. Die so aufgearbeitete Probe wird zur Derivatisierung mittels o-Phenylendiamin eingesetzt. Die Kalibriergeraden der Matrixkalibrierung sind Kapitel 8.2.1 zu entnehmen. Zur Ermittlung der Kalibriergeraden wurde jeder Kalibrierpunkt dreimal vermessen und der Mittelwert daraus gebildet. Die Wiederfindung einzelner Standards wurde aus der Kalibriergerade der Stammlösung ermittelt, indem die ermittelten Flächen der zu der Rohmilch zudosierten Standards in die für die Standardlösungen ermittelten Gleichungen eingesetzt wurden. So wurden Wiederfindungen von 98 % für 3-Desoxyglucosulose, 99 % für 3-Desoxypentulose, 99 % für Glyoxal und 99 % für Methylglyoxal erhalten. Die Bestimmungsgrenzen (BG) wurden mit 0,15 mg/ l für 3-

Deoxyglucosulose, 0,16 mg/l für 3-Desoxypentosulose, 0,06 mg/ l für Glyoxal und 0,07 mg/ l für Methylglyoxal abgeschätzt.

4.5.2.2 Bestandsaufnahme von α -Dicarbonylen in Milchprodukten

Die in 3.2.1 aufgeführten Handelsproben wurden auf den Gehalt von α -Dicarbonylverbindungen nach der in 4.5.2.1 beschriebenen Aufarbeitung und Matrixkalibrierung untersucht. In Abbildung 4.5.2.2-1 sind einige RP-HPLC Chromatogramme der mit o-Phenylendiamin derivatisierten Milchproben dargestellt. Die Zuordnung einzelner 1,2-Dicarbonylverbindungen erfolgte durch den Vergleich von Retentionszeiten der Standardverbindungen Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxypentosulose und 3-Desoxyglucosulose (Abb. 4.5.2.2-1, **A**) mit den Retentionszeiten der Signale der zu analysierenden Proben (Abb. 4.5.2.2-1, **B** bis **D**). Durch die Zudotierung der Stammlösung zu der Probenmatrix konnte anhand von übereinstimmenden Retentionszeiten im Chromatogramm bestätigt werden, dass es sich bei den mit Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxypentosulose und 3-Desoxyglucosulose bezeichneten Signalen tatsächlich um diese Verbindungen handelt. Die Aufnahme von 3D-Spektren mittels RP-HPLC mit Dioden Array Detektion von Stammlösung und Proben nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin ergab charakteristische, chinoxalinspezifische Absorptionsspektren sowohl für Standardverbindungen als auch für die einzelnen Proben. Wie in Abb. 4.5.2.2-1, **B** bis **D** zu sehen, sind 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose in allen Proben deutlich nachweisbar. Glyoxal- und Methylglyoxalgehalte befinden sich dagegen im Bereich der Bestimmungsgrenze.

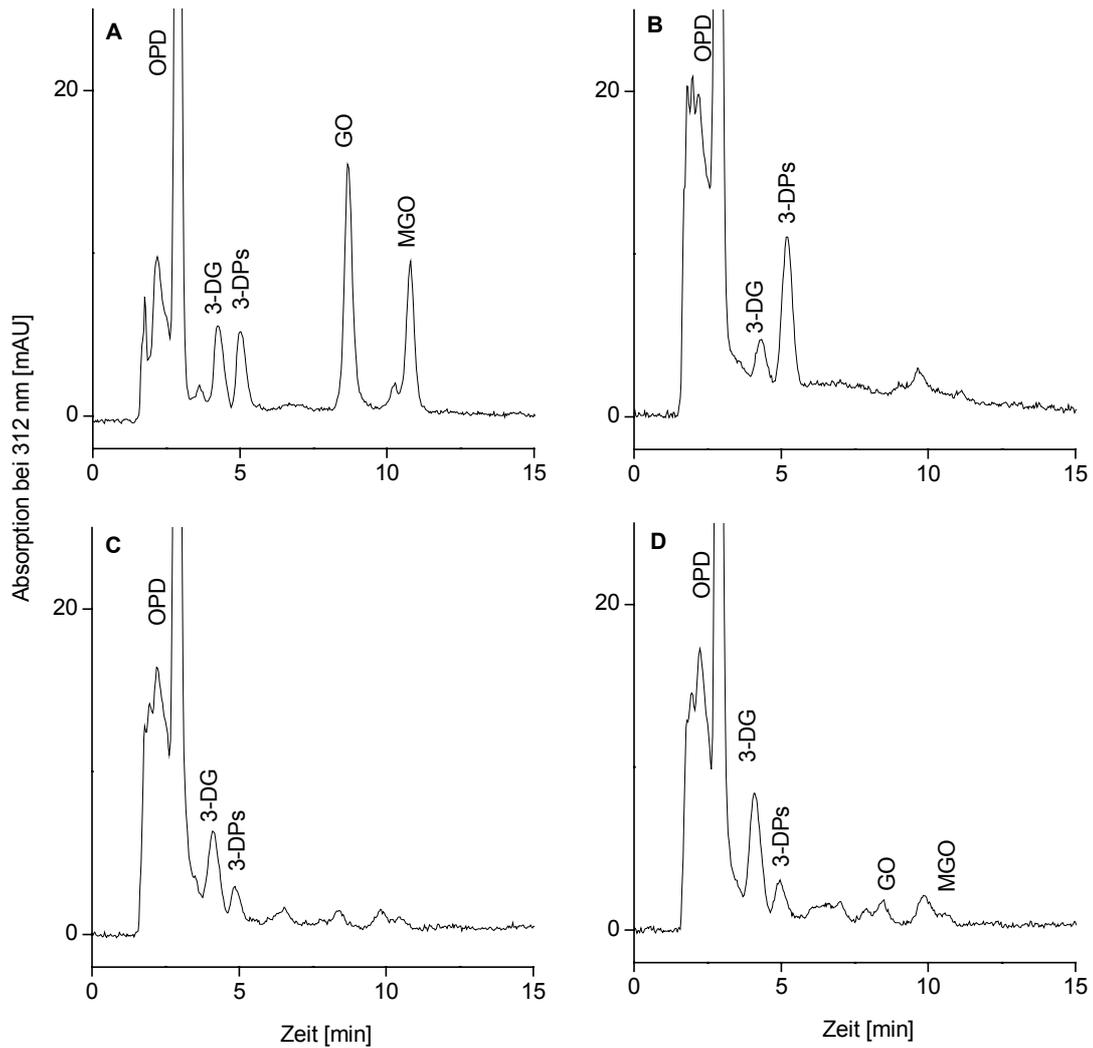


Abbildung 4.5.2.2-1: RP-HPLC Chromatogramme gemessen im UV bei 312 nm nach der Derivatisierung mit OPD von **A** Stammlösung bestehend aus 3-Desoxyglucosulose (8,2 mg/ l), 3-Desoxypentosulose (8,3 mg/ l), Glyoxal (2,9 mg/ l) und Methylglyoxal (5,8 mg/l); **B** einer Kakaomilch; **C** einer Kaffeesahne; **D** einer UHT-Milch

In den meisten Milchproben konnten die 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose bestimmt werden. In Tabelle 4.5.2.2-1 sind Gehalte der α -Dicarbonylverbindungen ausgewählter Milchprodukte aufgeführt.

Tabelle 4.5.2.2-1: Gehalte von 3-Desoxyglucosulose (3-DG), 3-Desoxypentosulose (3-DPs), Glyoxal (GO) und Methylglyoxal (MGO) in ausgewählten Milchprodukten

Probe	3-DG [mg/l]	3-DPs [mg/l]	GO [mg/l]	MGO [mg/l]
Rohmilch	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
pasteurisierte Milch	n.n.	0,16 ± 0,06	n.n.	n.n.
UHT-Milch	< BG	< BG	n.n.	n.n.
Kondensmilch 1	0,75 ± 0,15	< BG	n.n.	n.n.
Kondensmilch 2	0,86 ± 0,24	0,35 ± 0,13	n.n.	n.n.
Kondensmilch 3	0,91 ± 0,24	0,46 ± 0,04	0,06	
Kaffeesahne 1	0,52 ± 0,04	<BG	n.n.	n.n.
Alpen-Kaffeesahne	0,42 ± 0,15	0,23 ± 0,08	n.n.	n.n.
Hochwald-Kaffeegluck	0,49 ± 0,13	0,34 ± 0,07	n.n.	n.n.
Kakaomilch 1	0,53 ± 0,07	3,28 ± 0,53	0,22	n.n.
Kakaomilch 2	0,46 ± 0,11	0,52 ± 0,04	n.n.	n.n.
Kakaomilch 3	3,18 ± 0,60	4,75 ± 0,94	3,38 ± 0,13	<BG
Kakaomilch 4	3,55 ± 1,33	n.b.	0,87 ± 0,04	0,07 ± 0,04
Säuglingsnahrung	0,24	n.n.	n.n.	n.n.
Magermilchpulver hypoallergene	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Babynahrung	<BG	n.n.	0,14	n.n.

n.n. nicht nachweisbar

*BG: Bestimmungsgrenzen: 3-DG: 0,15 mg/l, 3-DPs: 0,16 mg/l, GO: 0,06 mg/l, MGO 0,07 mg/l

Betrachtet man die Gehalte an 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose für Rohmilch, pasteurisierte und UHT-Milch, so kann man eine Tendenz zur Zunahme der Gehalte mit der Hitzebehandlung erkennen. In allen sterilisierten Proben konnten 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose bestimmt werden. In 4.5.1 wurde angenommen, dass 3-Desoxypentulose bei niedrigeren Temperaturen zu 3-Desoxypentosulose reagiert, und in solchen Lebensmitteln selbst nicht nachweisbar ist. Die Bestimmung von 3-Desoxypentosulose in pasteurisierter Milch bestätigt diese Vermutung. Da aber wiederum in der UHT-Milch der Gehalt an 3-Desoxypentosulose unterhalb der Bestimmungsgrenze lag, muss diese Vermutung an Modellansätzen mit einer Rohmilch bestätigt werden, indem die Rohmilch erhitzt und auf den Gehalt von 3-Desoxypentulose und 3-Desoxypentosulose untersucht wird. Des Weiteren soll ein breiteres Spektrum an Milchproben auf den Gehalt von 3-Desoxypentosulose und 3-Desoxypentulose untersucht werden. In einigen Lebensmitteln sind bisher Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl bestimmt worden (vgl. 2.1.3.1). In fermentierten Lebensmitteln wie z.B. Joghurt oder Wein sind Glyoxal und Methylglyoxal in höheren Konzentrationen zu finden, was auf enzymatische Prozesse und nicht auf die Maillard-Reaktion zurückzuführen ist. 3-Desoxyglucosulose wurde in Honigen (*Weigel et al., 2004*) von 79 bis 1266 mg/ kg

bestimmt (siehe 2.1.3.1). Bisher gibt es in der Literatur keine Angaben über den Gehalt an 3-Desoxypentosulose in Lebensmitteln. Wie aus Tabelle 4.5.2.2-1 ersichtlich, ist sie in einigen Produkten nachweisbar. Die Bestimmung bedarf jedoch weiterer Optimierung und Bestätigung mit einer weiteren Messmethode wie z.B. GC-MS oder RP-HPLC unter Verwendung anderer Abfangreagenzien als o-Phenylendiamin. In weiteren Studien wäre zu prüfen, ob ein cytotoxisches, antibakterielles, kanzerogenes oder mutagenes Potential von 3-Desoxypentosulose ausgeht, und ob sie als Zuckerabbauprodukt in Lebensmitteln von Bedeutung ist, sowie als Precursor für die Bildung von Maillard-Produkten fungiert.

Es stellte sich heraus, dass einige Milchprodukte mit der in 3.7.1 beschriebenen Probenaufarbeitung bzw. mit der in 3.3.2.3 aufgeführten RP-HPLC Methode nicht untersucht werden können. Alle mit Vitaminen angereicherten oder aromatisierten Milchgetränke zeigten im RP-HPLC-Chromatogramm Signale, die zu den Hauptinhaltsstoffen zu gehören schienen, aber kein chinoxalintypisches UV-Absorptionsspektrum aufwiesen, jedoch mit den zu bestimmenden Carbonylverbindungen koeluierten. Besonders problematisch für die Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in der Milchmatrix zeigten sich die mit Vanille aromatisierten Getränke. Nach der Derivatisierung und Vermessung solcher Milchproben wurden Chromatogramme mit Signalen sehr hoher Intensität bei ca. 5 min Retentionszeit erhalten (Abb. 4.5.2.2-2).

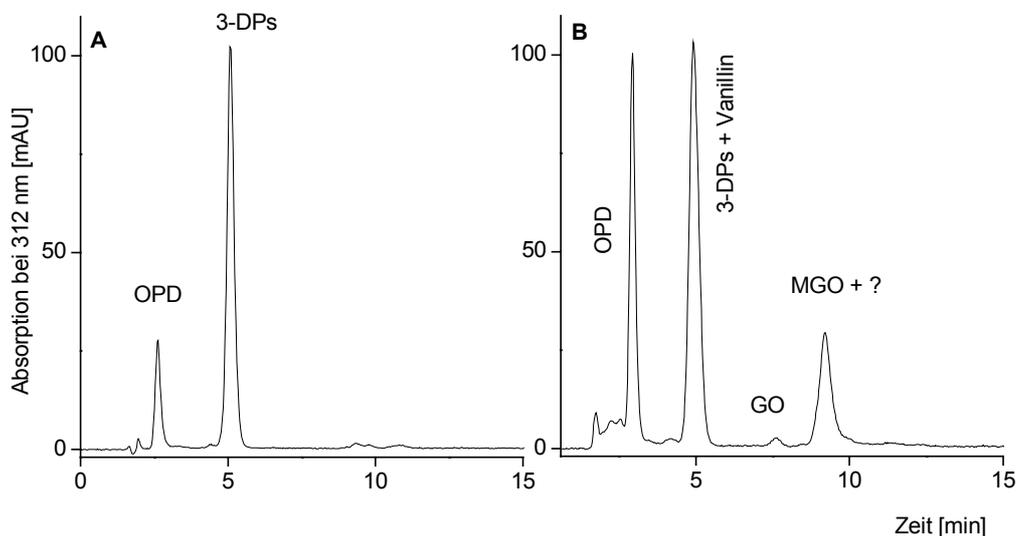


Abbildung 4.5.2.2-2: RP-HPLC Chromatogramme gemessen im UV bei 312 nm nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin von **A** 0,5 mmol/ l 3-Desoxypentosulose in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,0; **B** Vanillepudding

Es wurden mehrere vanillehaltige Milchprodukte untersucht. In Abbildung 4.5.2.2-2 ist das Chromatogramm einer Vanillepuddingprobe dargestellt (**B**). Bei allen vanillehaltigen

Probenmaterialien wurden ähnliche Chromatogramme erhalten, die ein Signal mit derselben Retentionszeit wie die 3-Desoxypentosulose (A) aufwiesen. Da diese Verbindung auch in underivatisierten Proben detektierbar war, war es eindeutig, dass es sich dabei um keine 1,2-Dicarbonylverbindung handeln kann. Es wurde vermutet, dass es sich bei dieser Verbindung um das Vanillin handelt. Zum Nachweis des Vanillins in solchen Milchproben, wurde ein Vanillinstandard vor und nach der Derivatisierung vermessen. Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei der bei 5 min Retentionszeit eluierenden Verbindung in Vanillemilch um das Vanillin handelte. Alle Milchproben wurden daher in derivatisiertem und underivatisiertem Zustand gemessen, so dass dadurch alle "nicht-Chinoxaline" zum größten Teil ausgeschlossen werden konnten.

4.5.3 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig

Die Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in Honig basiert auf der Arbeit von *Weigel et al. (2004)*. Die Probenaufarbeitung besteht in der Herstellung einer verdünnten wässrigen Honiglösung, die mit o-Phenylendiamin umgesetzt wird und auf Chinoxaline mittels RP-HPLC untersucht wird. Auf eine Proteinfällung wie bei den Milchproben wurde (vgl. 4.5.2), hier verzichtet. Eine Bestandsaufnahme von Honigen unterschiedlicher Herkunft zeigte, dass sie sich bezüglich der Spektren und Gehalte an α -Dicarbonylverbindungen zum Teil stark voneinander unterscheiden. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass es Honige gibt, die sehr reich an α -Dicarbonylverbindungen sind, und dagegen auch solche, die einen sehr geringen Gehalt an α -Dicarbonylverbindungen aufweisen. Der Gesamtgehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen in einem carbonylarmen Honig betrug 137 mg/ kg, was um das ca. 30-fache höher liegt als die bei Milchproben bestimmten Gehalte an Carbonylverbindungen. Daher stellte sich die Frage, ob die Menge von 0,2 % o-Phenylendiamin im Ansatz bei allen Honigen ausreicht, um die vorhandenen 1,2-Dicarbonylverbindungen vollständig abzufangen. Dies ist bei carbonylreichen Honigen, deren Gesamtgehalt an 1,2-Dicarbonylverbindungen zwischen 1000 und 1500 mg/ kg liegt, nicht der Fall. Um quantitative Aussagen über den Gehalt einzelner im Honig vorkommenden Dicarbonylverbindungen treffen zu können, wurde zunächst eine Prüfung und Optimierung der Derivatisierungsbedingungen vorgenommen. Dazu wurden die Konzentration des Abfangreagenzes, der pH-Wert, sowie die Zeit der Derivatisierung so variiert, dass für die Bestimmung auch größerer Mengen von 1,2-Dicarbonylverbindungen im Honig optimale Bedingungen ermittelt wurden.

4.5.3.1 Optimierung der Probenaufarbeitung zur Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig

Zur Optimierung der Derivatisierung wurde 1 ml einer 15 %-igen wässrigen Lösung des Honigs 24 (vgl. 3.7.2.1) mit 0,3 ml einer 0,2 %, 0,5 %, 1,0 % und 2,0 %-igen wässrigen o-Phenylendiamin Lösung und 0,3 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 versetzt und 12 h lang unter Ausschluss von Licht derivatisiert. Es zeigte sich, dass eine 0,2 %-ige o-Phenylendiamin Lösung im Ansatz unzureichend war, um alle in Honigen vorkommenden α -Dicarbonylverbindungen zu erfassen. Beim Einsatz einer 0,5 %-igen o-Phenylendiamin Lösung wurden höhere Gehalte einzelner Dicarbonylverbindungen gefunden. 1 %-ige o-Phenylendiamin Lösung zeigte sich als optimal, da bei der Umsetzung mit der 2 %-igen o-Phenylendiamin Lösung annähernd gleiche bis zum Teil geringere Gehalte gefunden worden sind (*Wittmann et al., 2004*). *Weigel et al. (2004)* sowie *Glomb et al. (2001)* zeigten, dass die Umsetzung von o-Phenylendiamin mit α -Dicarbonylverbindungen schon nach 5 h in Modellansätzen abgeschlossen ist. Dabei reagieren die kurzkettigen Verbindungen wesentlich schneller als die langkettigen. Diese Beobachtung wurde auch am Beispiel von Honigen bestätigt. Honig 44 wurde bis zu 72 h bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht derivatisiert und anschließend vermessen. Methylglyoxal schien in wenigen Minuten vollständig abzureagieren, da sein Gehalt nach einer Stunde Inkubation nur unwesentlich anstieg im Vergleich zum Nullstundenwert und bis zu 72 h Derivatisierungszeit konstant blieb. 3-Desoxyglucosulose erfuhr dagegen einen Anstieg nach 1 h Derivatisierung und blieb relativ konstant bis zu 72 h. Glyoxal Gehalt konnte hier nicht ausgewertet werden, da der Glyoxal Gehalt im Honig 44 unterhalb von Bestimmungsgrenze lag. Somit wurde die Derivatisierungszeit für Honige auf 12 h festgelegt (*Wittmann et al., 2004*).

Der dritte für die Umsetzung wichtige Faktor ist der pH-Wert. Bisher wurde die Derivatisierungsreaktion bei pH 7,0 in Modellansätzen sowie in Milch und Milchprodukten, deren pH-Werte bei 6,2 bis 6,7 lagen, durchgeführt. Hier hat der 0,5 M Phosphatpuffer ausgereicht, um den pH-Wert konstant zu halten. Honig dagegen hat einen pH-Wert von 3 bis 5. Die pH-Werte der Honige 1 bis 53 bewegen sich im Bereich von 3,4 beim Honig Nr. 50, als Minimalwert, bis 5,1 beim Honig Nr. 53 als Maximalwert. Die meisten pH-Werte liegen im Bereich von 3,7 bis 4,0 (*Wittmann et al., 2004*). In Vorversuchen stellte sich heraus, dass der bis dahin verwendete Phosphatpuffer den Derivatisierungsansatz nicht im neutralen Bereich puffert. Daher wurde der pH-Wert des Puffers auf pH 6,5 gesenkt und die Derivatisierungsversuche wiederholt. Um den pH-Wert während der Derivatisierung konstant zu halten, wurden sowohl das Derivatisierungsreagenz (o-Phenylendiamin) als auch Honige in

0,5 M Phosphatpuffer pH 6,5 gelöst. Mit so optimierter Probenaufarbeitung wurden Honige auf den Gehalt an α -Dicarbonylverbindungen geprüft.

4.5.3.2 Bestimmung von Carbonylverbindungen in Honigen

Bisher wurden 3-Desoxyglucoson, Glyoxal, Methylglyoxal und das Glucoson in Honigen nachgewiesen und bestimmt (*Weigel et al., 2004*). Die Quantifizierung des Glucosons erfolgte indirekt über die Kalibrierung von 3-Desoxyglucoson. Dabei wurden 18 bis 262 mg Glucoson/ kg Honig bestimmt (*Weigel et al., 2004*). In unseren Untersuchungen stellte sich die Bestimmung des Glucosons als schwierig heraus. Es konnten keine konstanten Werte mit ausreichender Wiederholbarkeit erzielt werden. Der Bildungsmechanismus des Glucosons ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Eine Vermutung ist, dass es enzymatisch aus Glucose durch Glucoseoxidase und Abspaltung des Wasserstoffperoxids gebildet wird (*Liedke, 1999*). Diese Beobachtung konnte in unseren Studien anhand von Modellansätzen nicht bestätigt werden. Eine weitere Theorie zur Bildung von Glucoson ist, dass Glucoson bei der Oxidation des 1,2-Endiols von Glucose oder Fructose in Gegenwart von Sauerstoff oder anderen Oxidationsmitteln (z.B. Cu^{2+}) gebildet wird (*Belitz et al., 2001; Liedke, 1999*). *Glomb (2001)* diskutiert die Bildung von Glucoson aus einer radikalisch ablaufenden Oxidation des Zuckers. In seinen Untersuchungen wies er für die Inkubation von Glucoson unter anaeroben Bedingungen mit o-Phenylendiamin stetig abnehmende Mengen an Glucoson nach. Wir stellten bei unseren Versuchen zur Optimierung der Derivatisierungsdauer unter aeroben Bedingungen fest, dass das Chinoxalin des Glucosons stetig anstieg. Nach 72 h Derivatisierung mit o-Phenylendiamin war sein Gehalt dreifach höher als nach der Umsetzung für 24 h. Diese Untersuchungen zeigten, dass die Werte für Glucoson in Honig unzuverlässig sind, und dass man sie nur unter Vorbehalt bzw. unter Berücksichtigung der Reaktionsbedingungen interpretieren kann. Im Weiteren wurden deshalb keine Gehalte für das Glucoson aufgeführt.

Vor der Untersuchung der Honige wurde eine Kalibrierung durchgeführt, indem eine Stammlösung bestehend aus Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucoson hergestellt und wie in Tabelle 3.7.2.2-1 dargestellt, verdünnt wurde, um die in Tabelle 3.7.2.2-1 aufgeführten Gehalte zu erhalten. Jede Verdünnung wurde zweimal vermessen, der Mittelwert daraus gebildet und die Kalibriergeraden für einzelne 1,2-Dicarbonylverbindungen erstellt. Kalibriergeraden und die dazugehörige Gleichungen sind Kapitel 8.2.2.1 zu entnehmen. Die Wiederfindungen für einzelne 1,2-Dicarbonylverbindungen wurden aus der Kalibriergerade der Stammlösung ermittelt (vgl. 7.2.2.1), indem die ermittelten Flächen der zu einer 15 %-igen Lösung des Honigs 24 in 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,5 zudotierten Stammlösung in zwei

4 Ergebnisse und Diskussion

verschiedenen Verdünnungen entsprechend Kalibrierpunkt 5 und 6 (vgl. Tabelle 3.7.2.2.-2) in die für die Standardlösungen ermittelten Gleichungen eingesetzt wurden. So wurden Wiederfindungen von 95 % für 3-Desoxyglucosulose, 97 % für Glyoxal und 97 % für Methylglyoxal erhalten. Die Bestimmungsgrenze wurde mit 0,10 mg/ kg für 3-DG, 0,04 mg/ kg für GO und 0,05 mg/ kg für MGO abgeschätzt.

Zur Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honigen wurden 30 %-ige Lösungen von Honigen in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 (vgl. Tabelle 7.2.2.2-1) bzw. pH 6,5 (vgl. Tabelle 7.2.2.2-2) eingewogen, diese auf 15 %-ige Lösungen mit entsprechendem Phosphatpuffer verdünnt und nach der Derivatisierung mit o-Phenylendiamin mittels RP-HPLC untersucht. Beispiele der sich für die einzelnen Honige unterscheidenden Chromatogramme sind in Abbildung 4.5.3.2-1 dargestellt.

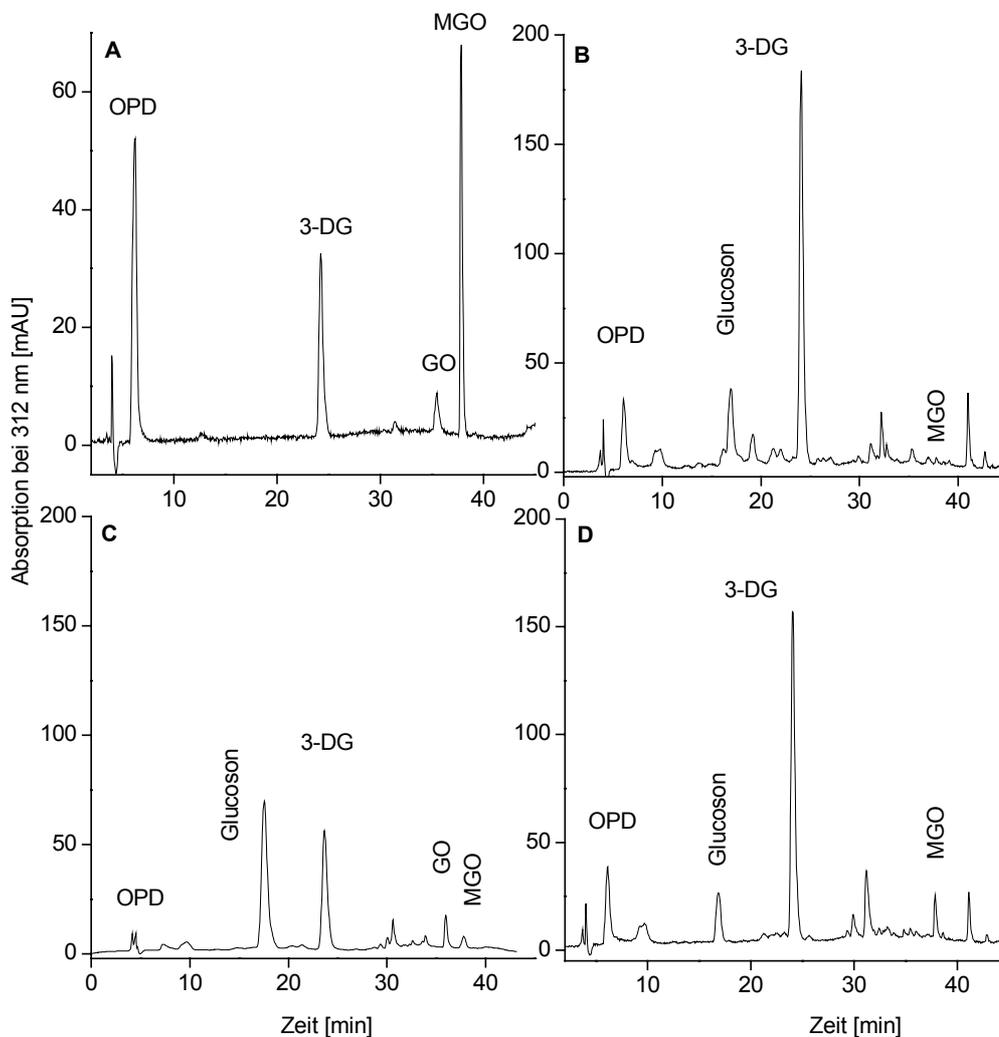


Abbildung 4.5.3.2-1: RP-HPLC Chromatogramme gemessen im UV bei 312 nm nach der Derivatisierung mit OPD von **A** Stammlösung: 3-DG 155 mg/l; GO 12 mg/l; MGO 45 mg/l; **B** Honig Nr. 26, Waldhonig; **C** Honig Nr. 8, Blütenhonig und **D** Honig Nr. 46, Wild Flora Aktive Honey 10⁺

Es sind Chromatogramme einer Honigprobe des Imkerverbandes Dresden (**C**), eines käuflich erhältlichen Waldhonigs (**B**) und eines neuseeländischen Blütenhonigs, Wild Flora Honey (**D**) dargestellt. Sie weisen unterschiedliche Spektren an einzelnen 1,2-Dicarbonylverbindungen auf, was aus den Peakhöhen in Chromatogrammen ersichtlich ist. Unterschiede in den Peakhöhen bei 3-Desoxyglucosulose und bei Glucoson sind bei Waldhonig (**B**) und Blütenhonig (**C**) deutlich, wobei man den Blütenhonig als einen der carbonylarmen Honige betrachten kann. Überraschenderweise zeigten manche neuseeländischen Honige unerwartet hohe Signale für Methylglyoxal. Hierbei handelt es sich vor allem um die Honige 41 bis 44, die zu den Manuka-Honigen gehören (vgl. 2.4.3). Dies ist in Abbildung 4.5.3.2-2 **A** dargestellt. Zum Vergleich zum unerwartet hohen Methylglyoxal Peak in Manuka-Honig 20+ ist in Abbildung 4.5.3.2-2 **B** nochmals das Chromatogramm des Honigs 26 (Waldhonig) dargestellt, welcher viel 3-Desoxyglucoson und wenig Methylglyoxal aufweist. Verglichen mit der Stammlösung (Abb. 4.5.3.2-1, **A**) ist die Peakintensität bei Manuka-Honig 20+ um fast das Zehnfache höher als bei dem Standard mit einer Konzentration von 45 mg MGO/ l. In Abbildung 4.5.3.2-2 **A** ist ein Ausschnitt aus dem Overlay-Chromatogramm der Manuka-Honige UMF 10+ (Nr.43) und UMF 20+ (Nr. 44) dargestellt, wo eindeutig zu sehen ist, dass Methylglyoxal bei Manuka-Honig UMF 20+ eine fast doppelt so große Peakfläche aufweist als bei Manuka-Honig UMF 10+.

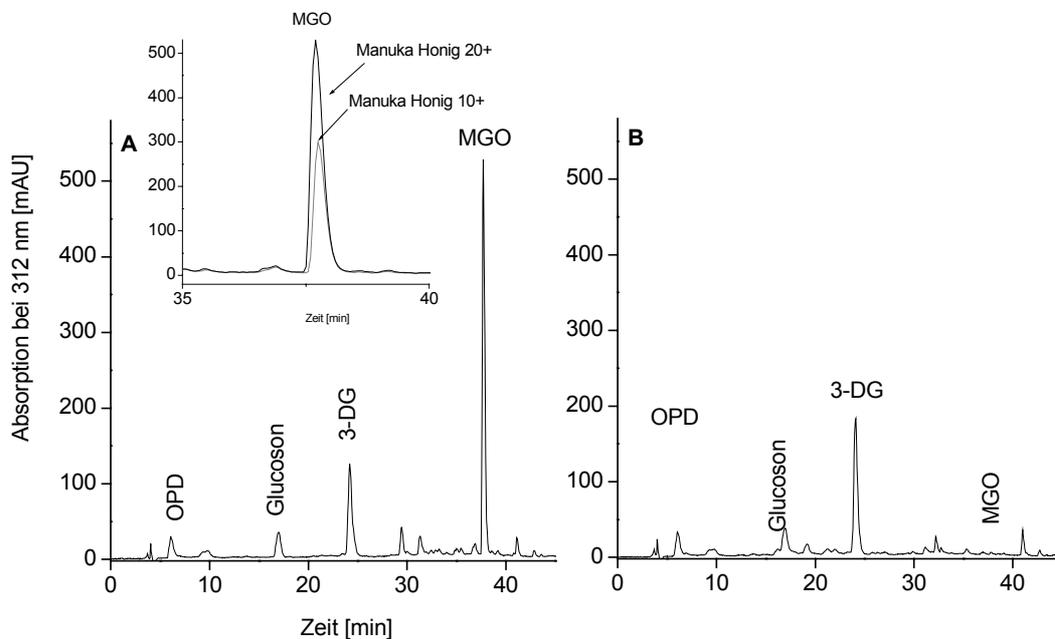


Abbildung 4.5.3.2-2: RP-HPLC Chromatogramme gemessen im UV bei 312 nm nach der Derivatisierung mit OPD von **A** Honig Nr. 44, Manuka-Honig UMF 20+ und **B** Honig Nr. 26, Waldhonig

4 Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund des hohen antibakteriellen Potentials werden Manuka-Honige mit dem so genannten "UMF-Faktor" (Unique Manuka Faktor) versehen, der als ein Qualitätsmerkmal für diese Honige betrachtet werden kann. Ein Manuka-Honig mit dem UMF-Wert von 10 soll eine antibakterielle Aktivität aufweisen, die vergleichbar ist mit der antibakteriellen Aktivität einer 10 %-igen phenolischen Lösung (Allen et al., 1991). Je höher der UMF-Wert ist, um so höheres antibakterielles Potential weist der Honig auf. Dies wird als eine Werbemaßnahme für die Vermarktung dieser Honige genutzt. Da Manuka-Honige für ihre besonders ausgeprägten antibakteriellen Eigenschaften bekannt sind (vgl. 2.4.2.4), und es Studien gibt, die darauf hinweisen, dass das antibakterielle Potential der Honige mit dem Gehalt an Kohlenhydraten im Zusammenhang steht (Suortti et al., 1984), stellt sich hier die Frage, ob die antibakteriellen Eigenschaften der Manuka-Honige mit hohen Methylglyoxalgehalten zusammenhängen.

Die mit Hilfe der Kalibriergeraden (vgl. 8.2.2.1) ermittelten Gehalte (Doppelbestimmung) von 3-Desoxyglucosulose, Glyoxal und Methylglyoxal sind in der Tabelle 4.5.3.2-1 dargestellt.

Tabelle 4.5.3.2-1: Gehalte von 3-Desoxyglucosulose (3-DG), Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO) und 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in Honigen Nr. 1 bis 53

Honignummer	c (3-DG) [mg/ kg]	c (GO) [mg/ kg]	c (MGO) [mg/ kg]	HMF [mg/ kg]
1	119	< BG	2,6	2,8
2	337	0,2	3,1	2,5
3	222	1,5	4,5	5,1
4	572	3,3	6,7	6,6
5	361	0,8	3,9	3,7
6	366	3,3	4,4	2,7
7	1451	3,6	5,7	6,3
8	224	1,9	5,3	3,9
9	530	0,9	4,0	1,2
10	252	2,4	6,6	5,0
11	456	0,8	4,6	3,9
12	195	0,7	9,4	3,6
13	322	2,1	3,2	2,6
14	307	1,7	3,5	2,8
15	562	1,2	3,7	1,9
17	335	3,9	4,7	2,6
18	274	2,3	5,7	4,4
19	258	1,8	5,5	1,8
20	257	1,9	5,5	3,9
21	168	1,6	3,1	1,3
22	160	2,8	4,3	9,3

4 Ergebnisse und Diskussion

Honignummer	c (3-DG) [mg/ kg]	c (GO) [mg/ kg]	c (MGO) [mg/ kg]	HMF [mg/ kg]
23	372	0,8	2,5	6,6
24	1045	1,2	2,5	5,7
25	708	2,0	0,5	10,9
26	1219	2,3	2,2	5,8
27	490	1,3	1,1	15,7
28	415	1,6	1,1	8,3
29	512	1,2	3,4	23,0
30	754	1,0	4,6	11,4
31	347	1,0	2,4	9,8
32	1060	0,7	38,4	3,0
33	135	0,9	1,2	1,0
34	301	1,3	3,1	3,2
35	295	< BG	< BG	2,3
36	574	1,8	2,6	8,6
37	329	2,3	3,5	7,0
38	451	4,6	3,6	3,5
39	179	1,5	2,1	2,3
40	933	2,1	3,08	75,1
41	668	3,0	347	22,6
42	563	3,9	411	17,6
43	747	1,2	416	21,3
44	807	4,2	743	43,9
45	279	2,8	16,2	3,5
46	1104	4,3	17,4	50,4
47	419	1,6	68,8	5,4
48	681	3,0	32,5	6,8
49	334	2,7	3,2	12,5
50	358	1,2	< BG	18,0
51	394	2,2	46,3	10,7
52	509	1,6	40,1	4,6
53	836	2,6	20,1	1,4

Bezüglich der Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen bestehen bedeutende Unterschiede zwischen den einzelnen Honigen. So haben die Honige 7, 24, 26, 32 und 46 Gehalte an 3-Desoxyglucosulose höher als 1000 mg/ kg, wogegen im Honig Nr. 1 nur 119 mg/ kg 3-Desoxyglucosulose bestimmbar waren. Die Gehalte von Glyoxal sind mit dem Durchschnittswert von 2 bis 3 mg/ kg in allen Honigen vergleichbar. Wie in Abb. 5.5.3.2-2 A dargestellt, wurden hohe Gehalte an Methylglyoxal mit 347 bis 743 mg/ kg in den Manuka-Honigen gefunden. Nur geringe Unterschiede im Methylglyoxalgehalt sind zwischen einem Manuka-Honig ohne Auszeichnung (Nr. 41), Manuka "aktiv" (Nr. 42) und Manuka UMF 10+ (Nr. 43) nachweisbar. Demgegenüber zeigte der Manuka-Honig UMF 20+ einen fast doppelt so hohen Gehalt an Methylglyoxal wie der Manuka-Honig UMF 10+. Da es sich hierbei um

Gehalte an Methylglyoxal handelt, die in solchen Größenordnungen noch nie in einem Lebensmittel gemessen wurden, wurden Versuche vorgenommen, um die eindeutige Identität dieser bei 38 min Retentionszeit eluierenden Verbindung zu prüfen. Dies wurde mittels einer RP-HPLC mit Dioden Array Detektion durchgeführt, indem Spektren bzw. Absorptionsmaxima des Methylglyoxal Standards mit dem bei ca. 38 min eluierenden Peak im Honig verglichen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Absorptionsmaxima beider Verbindungen im Bereich von einer Minute übereinstimmen. Den zweifelsfreien Nachweis der Identität des bei 38 min eluierenden Peaks im Chromatogramm der Manuka-Honige lieferte die LC-MS Messung. Dies erfolgte nach der in 3.3.5 beschriebenen Methode. Hierzu wurden Stammlösungen bestehend aus Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose und Manuka-Honig UMF 20+ nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin untersucht. Die massenspektroskopische Messung wurde im positiven Modus durchgeführt, so dass die erhaltenen Massezahlen als $[MH]^+$ gemessen wurden. Die Werte für m/z gemessen als $[MH]^+$ für die Chinoxaline der 3-Desoxyglucosulose von 235,3, Glyoxal von 131,1 und Methylglyoxal von 145,2 (Abb. 4.5.3.2-3, rechts) wurden im Standard und in den Probelösungen bestätigt. Wie in Abbildung 4.5.3.2-3 zu sehen, ist eine eindeutige Übereinstimmung der Retentionszeiten des Methylglyoxal-Chinoxalins in der Stammlösung und in der Honigprobe vorhanden. Durch gleichzeitige Kombination von massenspektroskopischer und Dioden Array Detektion, konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei der in Manuka-Honigen bei ca. 38 min Retentionszeit eluierenden Verbindung tatsächlich um Methylglyoxal handelt. Des Weiteren ist es durch die Extraktion von einzelnen für Methylglyoxal charakteristischen Ionenspuren aus dem Total Ion Current (TIC) und durch den Vergleich der Absorptionsmaxima dieser ausgewählter Ionenspuren und dazugehöriger Retentionszeiten im Chromatogramm gelungen, Methylglyoxal in Manuka-Honig als reine Verbindung zu identifizieren.

Vergleichbar hohe Gehalte an Methylglyoxal wurden bisher noch nicht für ein Lebensmittel gemessen. Die höchsten in der Literatur veröffentlichten Gehalte an Methylglyoxal wurden mit 35 mg/l in Essig (*Rodrigues et al., 1999*) und 47 mg/ kg im entkoffeinierten Kaffee (*Revel et al., 1993*) bestimmt, womit der Methylglyoxal Gehalt in Manuka-Honigen um das 10 bis 20-fache höher liegt als der im Essig oder im Kaffee. Bei einigen Honigen wiesen *Weigel et al. (2004)* sehr hohe Gehalte an 3-Desoxyglucosulose nach. Jedoch wurden bei diesen Honigproben keine auffällig hohen Gehalte an Methylglyoxal festgestellt. Aus diesen Untersuchungen folgt also, dass hohe Gehalte an Methylglyoxal scheinbar für neuseeländische Manuka-Honige charakteristisch sind.

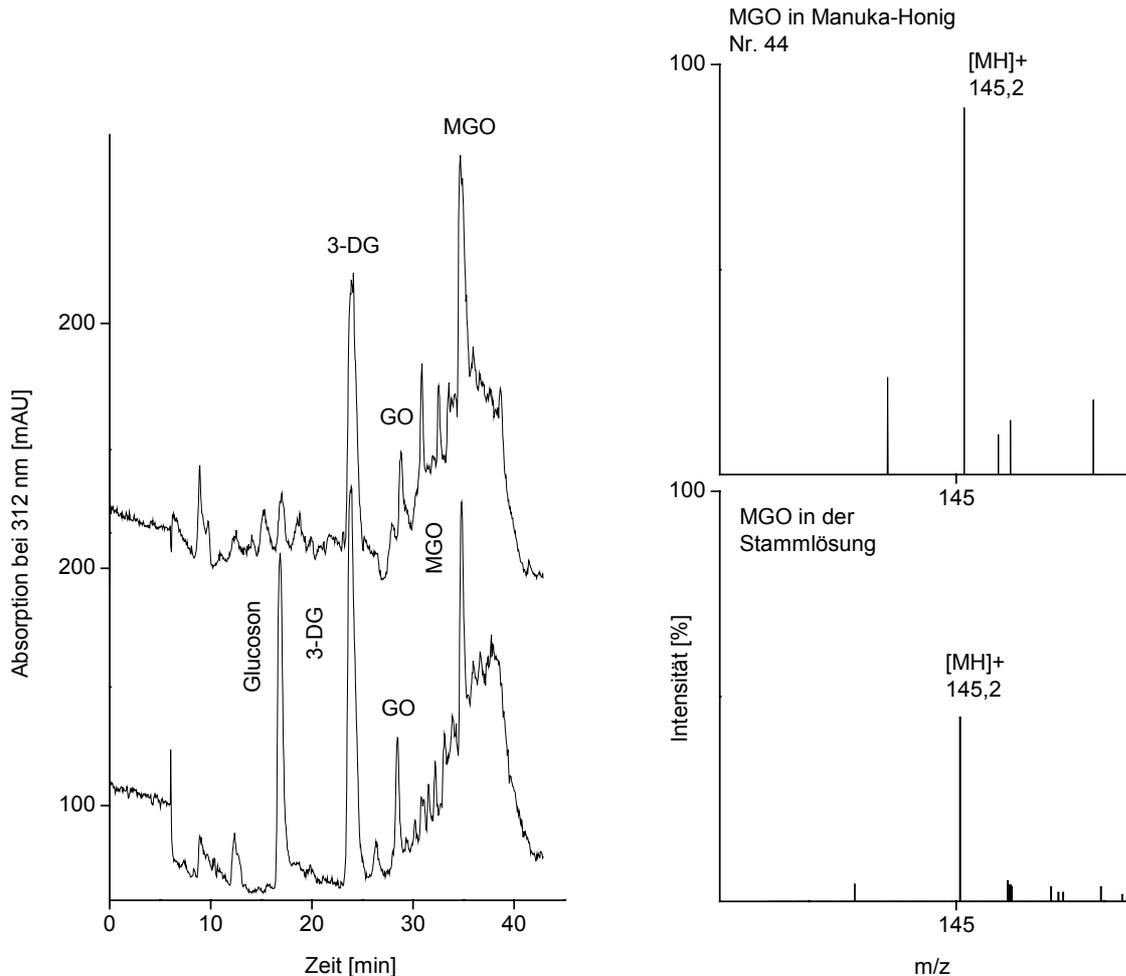


Abbildung 4.5.3.2-3: RP-HPLC Chromatogramme gemessen mit UV-Detektion bei 312 nm nach der Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin von einer Stammlösung (unten) und Manuka-Honig UMF 20+ (oben) und Ausschnitt aus dem Massenspektrum des Methylglyoxal-Chinoxalins bei ca. 38 min Retentionszeit

Diese Honige sind für ihre antibakteriellen Eigenschaften, die auf "nicht-peroxid Faktoren" beruhen, bekannt (Bogdanov *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1991). Wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, sind vier Inhibine des Honigs bisher in der Literatur bekannt. Besonders von Interesse sind dabei die so genannten "nicht-peroxid Faktoren", die ein hohes antibakterielles Potential aufweisen und nicht auf die Wirkung von H_2O_2 zurückführbar sind. Weston *et al.* (1999) untersuchten die antibakterielle Aktivität verschiedener Honige im Vergleich zu Manuka-Honigen, nachdem H_2O_2 mittels Katalase zerstört wurde. Die höchste antibakterielle Aktivität wies von allen untersuchten Honigen der Manuka-Honig auf. Nach dem Extrahieren des Honigs mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln und in mehrere Fraktionen in Abhängigkeit vom pH-Wert wurden einzelne Fraktionen auf antibakterielle Aktivität geprüft. Weston *et al.* (1999) zeigten, dass die höchste Aktivität in der Kohlenhydratfraktion vorhanden war, und dass die phenolischen Verbindungen in Manuka-Honigen nur zum

unwesentlichen Teil zur antibakteriellen Aktivität beitragen. Aufgrund dieser Tatsachen und unserer aktuellen Untersuchungen, stellte sich die Frage, ob der hohe Gehalt an Methylglyoxal für diese antibakterielle Wirkung verantwortlich sein kann.

Aus der Literatur ist es bekannt, dass Methylglyoxal sowohl antibakteriell als auch cytotoxisch wirkt. Der Arbeitskreis *Wieslander et al. (2001)* untersuchte die Cytotoxizität von hitzesterilisierten Lösungen für die Peritonealdialyse (PD) gegen L-929 Fibroblastenzellen von Mäusen. Sie haben nachgewiesen, dass PD-Lösungen *in vitro* cytotoxisch wirken, und dass die Cytotoxizität mit dem Gehalt an Zuckerabbauprodukten korreliert (*Wieslander et al., 1995*) (vgl. 2.1.2.3).

Wie der Tabelle 4.5.2.2-1 zu entnehmen, wurden in allen Honigen Gehalte an 5-Hydroxymethylfurfural bestimmt. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) ist das Produkt der fortgeschrittenen Maillard-Reaktion, welches aber auch im Laufe der Karamellisierung, d.h. aus dem Zuckerabbau in Abwesenheit von Aminokomponente, gebildet werden kann (siehe 2.1.2.1). HMF wird allgemein als Qualitätsparameter für die Hitzebehandlung von Lebensmitteln herangezogen. Besonders bei Honig dient er zur Beurteilung der eventuell vorgenommenen Wärmebehandlung bei der Gewinnung (vgl. Tabelle 2.4.1-1 und 2.4.1-3).

Zur Bestimmung des HMF-Gehaltes werden 10 %-ige wässrige Lösungen von Honigen 1 bis 53 hergestellt und mittels RP-HPLC mit der UV-Detektion (vgl. 3.3.2.4) untersucht. Die Ermittlung der Gehalte von HMF erfolgte mit Hilfe der Kalibriergerade, die mit der 5-Hydroxymethylfurfural Standardverbindung entsprechend 3.7.3 aufgenommen wurde. Die Kalibriergerade für das HMF ist in 8.2.3.1 dargestellt. Die Bestimmung von HMF in Honigen wurde in einer Doppelbestimmung vorgenommen. Die ermittelten Gehalte angegeben als Mittelwert aus zwei Bestimmungen sind in der Tabelle 4.5.2.2-1 dargestellt. Wie aus Tabelle 4.5.2.2-1 ersichtlich, sind die meisten untersuchten Honige arm an 5-Hydroxymethylfurfural. Der Honig mit dem höchst ermittelten Gehalt an HMF von 75 mg/ kg ist ein für mehrere Jahre gelagerter Honig, der als "Modell" für die Maillard-Reaktion und Bildung von Maillard-Produkten während der Lagerung herangezogen werden kann. So ein Honig ist laut HonigV nicht mehr verkehrsfähig. Im Vergleich zu den deutschen Honigen zeigen die neuseeländischen Honige leicht erhöhte Werte an HMF, was möglicherweise auf die klimatischen Einflüsse zurückzuführen ist. Außerdem kann man bei den „aktiven“ Honigen einen Zusammenhang zwischen HMF-Gehalt und der Auslobung feststellen. Bei Manuka-Honigen ist ein deutlicher Anstieg des HMF-Gehaltes mit dem UMF-Wert zu verzeichnen. Ähnlich verhält sich auch der Wild Flora Honey (Nr. 45 und 46).

4.5.4 Antibakterielle Eigenschaften von Honigen

4.5.4.1 Bestimmung des Wasserstoffperoxidgehaltes

Da Wasserstoffperoxid als das wichtigste Inhibin eingestuft und in zahlreichen Berichten für die antibakterielle Wirkung von Honig verantwortlich gemacht wird, wurde zunächst der H_2O_2 -Gehalt in einigen ausgewählten Honigen bestimmt (vgl. 3.7.2.1). Diese Untersuchung wurde halb-quantitativ mit Hilfe des Merckoquant-Peroxidstäbchentests durchgeführt (Wittmann *et al.*, 2004). Es wurden zwei Sets unterschiedlicher Empfindlichkeitsstufen eingesetzt. Die grobe Abschätzung des H_2O_2 -Gehaltes ist mit dem Testset (0-100) möglich, mit dem ein Konzentrationsbereich von 0-3-10-30-100 mg/l durch eine Änderung der blauen Färbung gemessen werden kann. Mit dem empfindlicheren Testset (0-25) ist eine genauere Interpretation der Farbänderung möglich. Dieser Test ermöglicht die Ablesung der H_2O_2 -Gehalte in Schritten 0-0,5-2-5-10-25 mg/l. In Abbildungen 4.5.4.1-1 und 4.5.4.1-2 sind verschiedene Färbungen der Teststäbchen, hervorgerufen durch Lösungen mit definierter Konzentration an Wasserstoffperoxid im Vergleich zu der vom Hersteller angegebenen Farbskala mit den dazugehörigen Konzentrationsangaben dargestellt.



Abbildung 4.5.4.1-1: Kalibrierung des Wasserstoffperoxidgehaltes von 0-0,5-2-5-10-25 mg H_2O_2 / l im Test (0-25); links: reale Färbung der Teststäbchen; rechts: Skala auf der Verpackung der Teststäbchen



Abbildung 4.5.4.1-2: Kalibrierung des Wasserstoffperoxidgehaltes von 0-1-3-10-30-100 mg H_2O_2 / l im Test (0-100). links: reale Färbung der Teststäbchen; rechts: Skala auf der Verpackung der Teststäbchen

Mit den hier beschriebenen Tests wurden die Honige 23 bis 53 auf den H_2O_2 -Gehalt untersucht. Dazu wurden 20 %-ige Lösungen hergestellt und diese wie in 3.7.4.1 beschrieben vorbereitet. Die für die Honige ermittelten H_2O_2 -Werte sind der Tabelle 4.5.4.1-1 zu entnehmen. Aufgrund der halb-quantitativen Auswertung erfolgte eine Einstufung in gering (+), mittel (++) und hoch (+++).

Tabelle 4.5.4.1-1: Abschätzung der H₂O₂-Gehalte in 20 %-igen wässrig verdünnten Honigen 23 bis 53 (pH 6,5)

Honignummer	Bewertung	Honignummer	Bewertung
23	+	39	++
24	++	40	-
25	++	41	+
26	+	42	+
27	+	43	+
28	++	44	+
29	+	45	+
30	+	46	++
31	+	47	+
32	+	48	+
33	++	49	+
34	+	50	++
35	++	51	++
36	++	52	+
37	++	53	++
38	+++		

- < 1 mg/ l; + = 1-3 mg/ l; ++ = 3-10 mg/ l; +++ = 10-30 mg/ l

Die meisten Honige zeichnen sich durch geringe H₂O₂-Gehalte von 1 bis 3 mg/ kg aus. Den niedrigsten Gehalt an Wasserstoffperoxid weist der jahrelang gelagerte Honig Nr. 40 auf. Auch die Manuka-Honige 41 bis 44 gehören zu den wasserstoffperoxidarmen Honigen. Außergewöhnlich hohen Gehalt an H₂O₂ zeigte der Honig Nr. 38, ein Waldblüten Honig, welcher mit 10 bis 30 mg H₂O₂ / kg als wasserstoffperoxidreich eingestuft werden konnte. Dieser Honig wurde aufgrund seines hohen Wasserstoffperoxidgehaltes zusammen mit den Honigen 26, 30, 32, 41 bis 48 auf antibakterielle Aktivität geprüft.

4.5.4.2 Antibakterielle Eigenschaften von 1,2-Dicarbonylverbindungen

Die Tests zur Untersuchung der antibakteriellen Aktivität von 1,2-Dicarbonylverbindungen und von Honigen wurden mittels Lochagardiffusionstest durchgeführt. Hierzu wurden Hefen, gram-positive und gram-negative Bakterienstämme (vgl. Tabelle 3.7.4.2-1) gegen Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucoson und 5-Hydroxymethylfurfural, sowie gegen einige ausgewählten Honiglösungen getestet. Lösungen von einzelnen 1,2-Dicarbonylverbindungen wurden entsprechend 3.7.4.3 hergestellt und direkt zum Lochagardiffusionstest eingesetzt. Die hierbei gewählten Konzentrationen entsprechen jeweils den maximalen Gehalten einzelner 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honigen. Die zur Kultivierung von Mikroorganismen verwendeten Medien sind in 3.7.4.2 beschrieben.

Gegen die Hefen *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae* sowie *Yarrowia lipolytica*, die auf YPD-Agar kultiviert wurden, konnte sowohl für die Standardlösungen in den Höchstkonzentrationen entsprechend 3.7.4.2 als auch bei Honiglösungen in wässrigen Verdünnungen bis 80 % kein antibakterielles Potential nachgewiesen werden. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wurden auf M9- und LB-Agar kultiviert und ihre Sensitivität gegenüber den einzelnen Standards sowie den Honigen geprüft. Es zeigte sich, dass im M9-Medium das Wachstum der Bakterien herabgesetzt wird, so dass alle weiteren Untersuchungen auf LB-Agar durchgeführt wurden. *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigten keine Sensibilität gegenüber der einzelnen 1,2-Dicarbonylverbindungen. Dagegen wurde *E. coli* nach der Inkubation für 20 h bei 37 °C mit Glyoxal und Methylglyoxal in den Höchstkonzentrationen von 580 mg/ kg (10 mmol/ l) für Glyoxal und 576 mg/ kg (8 mmol/ l) für Methylglyoxal im Wachstum gehemmt (vgl. Tabelle 3.7.4.2-2). *S. aureus* reagierte in diesen Tests am sensibelsten, was auch den Literaturangaben entspricht (Molan et al., 1992a). 3-Desoxyglucoson zeigte sich in diesen Tests mit bis 9200 mg/ kg (57 mmol/ l) Höchstkonzentration als nicht wirksam (Tabelle 4.5.4.2-1). Diese Konzentration an 3-Desoxyglucoson war etwa 10-fach höher als die in Honigen vorkommenden Konzentrationen, so dass demzufolge 3-Desoxyglucoson für das antibakterielle Potential in Honigen nicht mitverantwortlich sein kann. Da es Daten über die Cytotoxizität von 5-Hydroxymethylfurfural gibt (Wieslander et al., 1995), wurde auch 5-Hydroxymethylfurfural auf die antibakterielle Wirkung getestet. Auch im Fall des HMF konnte gezeigt werden, dass die in Honigen vorkommenden Konzentrationen von HMF das Wachstum von Mikroorganismen nicht hemmen können. Eine Lösung von 5-Hydroxymethylfurfural von 12,6 g/ l (100 mmol/ l) bewirkte keine Veränderungen im Wachstum von *E. coli* und *S. aureus* (Tabelle 4.5.4.2-1). Nachdem die qualitativen Untersuchungen ergaben, dass *E. coli* und *S. aureus* von Glyoxal und Methylglyoxal in ihrem Wachstum gehemmt werden, erfolgte die Bestimmung der MIC-Werte. Der MIC-Wert (minimum inhibitory concentration) drückt die minimale Konzentration einer Verbindung aus, die notwendig ist, um das Wachstum eines Mikroorganismus noch sichtbar zu hemmen (vgl. 2.4.3). Die für einzelnen Standardsubstanzen ermittelten MIC-Werte sind in der Tabelle 4.5.4.2-1 dargestellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 4.5.4.2-1: Antibakterielle Aktivität der Standardsubstanzen gegenüber *E. coli* und *S. aureus*

Standard	c [mmol/ l]	c [g/ kg]	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
HMF	100	12,6	-	-
3-DG	60	9,3	-	-
GO	6,9	0,4	MIC	+
	4,3	0,25	-	MIC
MGO	1,05	0,075	MIC	MIC

+ Hemmung vorhanden; - keine Hemmung vorhanden
MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

In Abbildung 4.5.4.2-1 ist zur Verdeutlichung der Auswertung des Lochagardiffusionstestes eine Verdünnungsreihe von Methylglyoxal in Konzentrationen von 0,125 g/ kg bis 0,05 g/ kg zur Ermittlung des MIC-Wertes dargestellt. Für 0,125 g/ kg sowie 0,100 g/ kg ist eine Hemmung des Bakterienwachstums erkennbar. Für 0,075 g MGO/ kg wurde der MIC-Wert festgelegt, da bei einer weiteren Verdünnung keine Hemmung des Bakterienwachstums mehr vorhanden war (von oben links nach unten rechts).

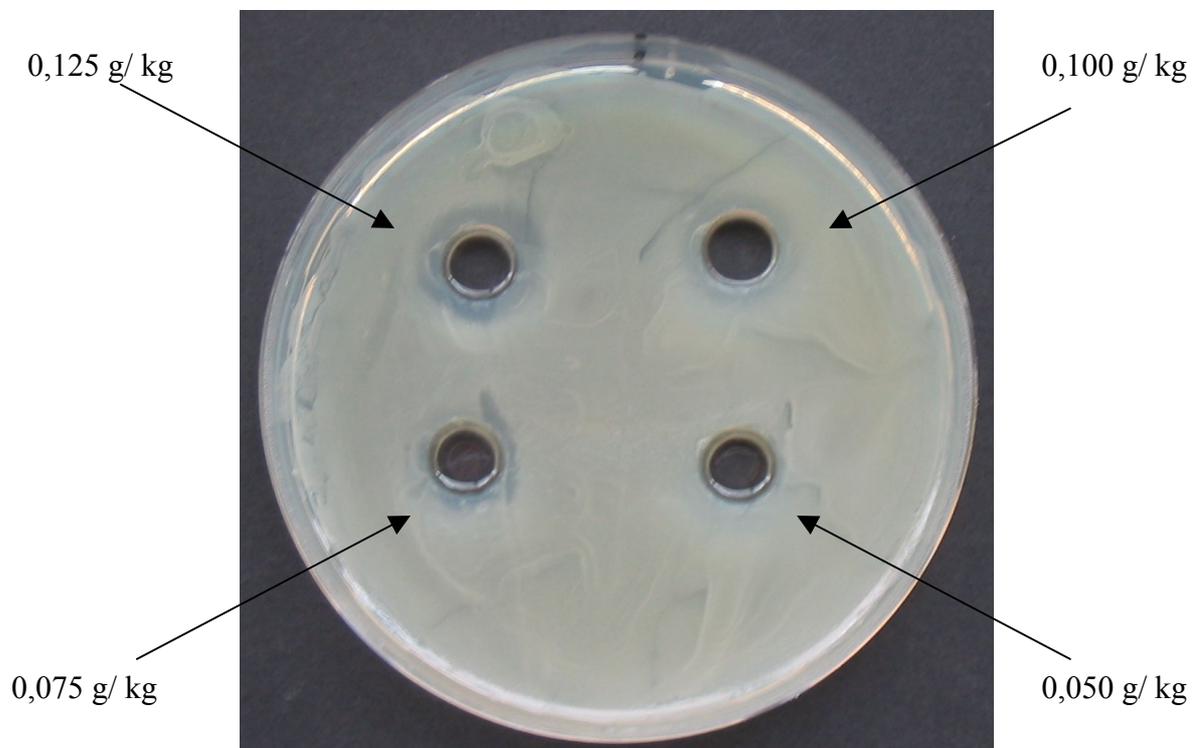


Abbildung 4.5.4.2.1: Lochagardiffusionstest des Methylglyoxal-Standards mit *S. aureus* in Konzentrationen: (links oben) 0,125 g/ kg; (rechts oben) 0,100 g/ kg; (links unten) 0,075 g/ kg; (rechts unten): 0,050 g/ kg

4 Ergebnisse und Diskussion

Aus der Tabelle 4.5.4.2-1 ist ersichtlich, dass der MIC-Wert für Glyoxal mit 4,3 mmol/ l für *S. aureus* etwas niedriger liegt als für *E. coli*, wo bei dieser Konzentration noch keine Hemmung des Wachstums mehr feststellbar ist. Beide Bakterienstämme werden durch Methylglyoxal ab einer Konzentration von 1,05 mmol/ l gehemmt.

Die für die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität relevanten Honige wurden in Abhängigkeit von der Herkunft, den ermittelten Gehalten an α -Dicarbonylverbindungen, sowie der abgeschätzten Wasserstoffperoxidgehalte ausgewählt. So wurde Honig Nr. 26 wegen des überdurchschnittlich hohen Gehaltes an 3-Desoxyglucosulose, Honig Nr. 30 wegen seines in der Summe durchschnittlichen Gehaltes an α -Dicarbonylverbindungen und Honig Nr. 32 wegen seines für deutsche Honige hohen Methylglyoxal-Gehaltes ausgewählt. Wie in 4.5.4.1 beschrieben wurde Honig 38 wegen seines hohen H₂O₂-Gehaltes auf die antibakterielle Aktivität getestet. Weiterhin wurden die neuseeländischen Honige 41 bis 48 auf ihr antibakterielles Potential untersucht. Für alle Honige wurden Verdünnungen von 80 bis 20 % (v/v) in Wasser hergestellt und die Lösungen mittels Lochagardiffusionstest untersucht, indem 150 μ l der Honiglösung in ein auf der Petrischale im Nährmedium ausgestanztes Loch gegeben und für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden (vgl. 3.7.4.2). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 4.5.4.2-2 dargestellt.

Tabelle 4.5.4.2-2: Antibakterielle Aktivität ausgewählter Honige gegenüber *E. coli* und *S. aureus*

Honignummer	Verdünnung [%]	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MGO _{Honig} bei MIC [mmol/l]
26	30- 80	-	-	< BG
30	30- 80	-	-	< BG
32	30- 80	-	-	< BG
38	30- 80	-	-	0,03- 0,12
41	55	MIC	+	2,4
	35	-	MIC	1,5
42	50	MIC	+	2,4
	30	-	MIC	1,4
43	35	MIC	+	1,7
	25	-	MIC	1,1
44	25	MIC	+	2,2
	20	-	MIC	1,8
45	30- 80	-	-	0,15- 0,06
46	30- 80	-	-	0,17- 0,06
47	30- 80	-	-	0,18- 0,48
48	30- 80	-	-	0,19- 0,5

Honig 26 zeigte trotz des Gehaltes von 1219 mg/ kg an 3-Desoxyglucoson sogar bei einer 80 %-igen Verdünnung keine Hemmung, sowohl bei *E. coli* als auch bei *S. aureus*. Auch für Honig 30 (Gesamtgehalt an α -Dicarbonylverbindungen von 801 mg/ kg) und Honig 32 (Methylglyoxal Gehalt von 38,4 mg/ kg) war keine antibakterielle Wirkung nachweisbar. Selbst der Honig 38 mit einem relativ hohen Gehalt an H_2O_2 (10 bis 30 mg/ kg) zeigte sich wider Erwarten als wenig wirkungsvoll gegenüber *S. aureus* und *E. coli*. Unter den gewählten Bedingungen wiesen auch die Honige 46 und 48, die als „aktive“ Honige bezeichnet sind und mit einem Faktor 10+ versehen sind, keine antibakterielle Wirkung auf. Eine deutliche inhibierende Wirkung gegenüber *E. coli* und *S. aureus* war unter den gewählten Bedingungen nur für die Honige 41 bis 44 nachweisbar. Für Honig 41, der keine besonderen Angaben bezüglich seiner Aktivität hat, wurde der MIC-Wert bei *S. aureus* bei einer 35 %-igen Verdünnung erreicht. Dies entspricht einer Konzentration an Methylglyoxal von 1,5 mmol/ l (108 mg/ kg). Für den "aktiven" Manuka-Honig (Nr. 42), ohne Auslobung bezüglich des UMF-Wertes, wurde der MIC-Wert für *S. aureus* bei einer Verdünnung von 30 % ermittelt, was einer Konzentration an Methylglyoxal von 1,4 mmol/ l (100 mg/ kg) entspricht. Vergleicht man den MIC-Wert für den Manuka-Honig UMF 10+ mit den MIC-Werten der anderen beiden Manuka-Honigen, so kann man erkennen, dass der ermittelte MIC-Wert mit der Auslobung bzw. mit dem UMF-Wert zusammenhängt. Der MIC-Wert für Honig 43 liegt bei einer 25 %-igen wässrigen Verdünnung, was einem Gehalt an Methylglyoxal von 1,1 mmol/ l (79 mg/ kg) entspricht. Bei dem Manuka-Honig UMF 20+ (Nr. 44) liegt der MIC-Wert bei einer noch geringeren Verdünnung von 20 %, allerdings entspricht dies einem höheren Gehalt an Methylglyoxal (1,8 mmol/l oder 129 mg/ kg). Die Ermittlung des MIC-Wertes der Honige ist am Beispiel des Manuka-Honigs UMF 20+ in Verdünnungen von 10 bis 25 % (v/v) in Abbildung 4.5.4.2-2 gezeigt. Analog zur Abbildung 4.5.4.2-1 ist auch hier ein Zusammenhang zwischen der Verdünnung des Honigs und der Hemmung des Bakterienwachstums zu beobachten. Bei einer 25 %-igen wässrigen Verdünnung des Honigs Nr. 44 ist ein eindeutiger Hemmhof (oben links) zu sehen. Wird der Honig immer weiter verdünnt, so wird der Hemmhof immer kleiner, bis bei einer 10 %-igen Verdünnung (unten rechts) keine Hemmung des Wachstums von *S. aureus* mehr vorhanden ist. Als MIC-Wert für den Manuka-Honig UMF 20+ (Nr. 44) wurde eine 20 %-ige Verdünnung (oben rechts) ermittelt.

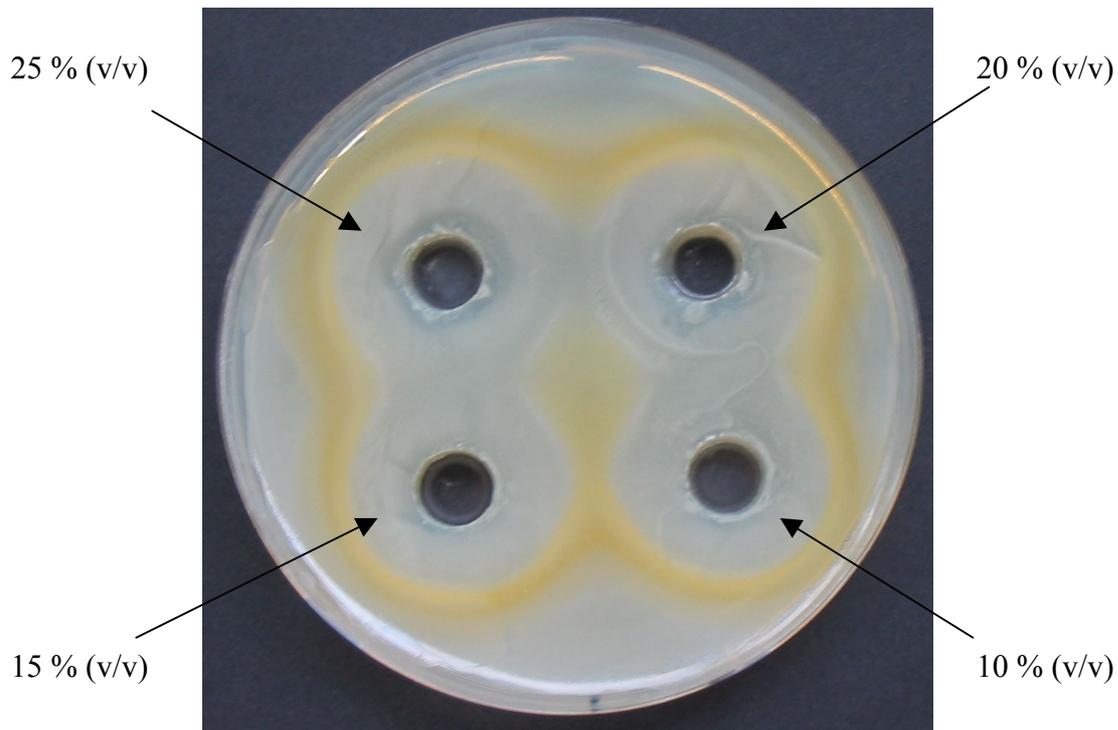


Abbildung 4.5.4.2-2: Lochagardiffusionstest des Honigs 44 gegen *S. aureus*: links oben: 25 % (v/v); rechts oben: 20 % (v/v); links unten: 15 % (v/v); rechts unten: 10 % (v/v)

Durch Vergleich der für Methylglyoxal Lösung ermittelten MIC-Werte mit den sich rechnerisch für Honige ergebenden Methylglyoxal Konzentrationen kann man feststellen, dass die MIC-Werte der reinen Standards mit den Werten der Honigproben vergleichbar sind (Tabelle 4.5.4.2-1 und 4.5.4.2-2). Der MIC-Wert der Methylglyoxal Lösung liegt bei 75 mg/kg, wogegen der MIC-Wert des Manuka-Honigs UMF 10+ (Nr. 43) bei einem Gehalt von Methylglyoxal von 79 mg/kg ermittelt werden konnte. Andere Honige zeigen vergleichbare Konzentrationen von Methylglyoxal bei den entsprechenden MIC-Werten, sind jedoch etwas höher als der für die Methylglyoxal Lösung ermittelte MIC-Wert. Da der Manuka-Honig UMF 20 + einen MIC-Wert bei einer 20 %-igen Verdünnung aufweist, was einem Gehalt an Methylglyoxal von 192 mg/kg beim MIC-Wert entspricht, ist es wahrscheinlich, dass er weitere antibakteriell wirksame Inhaltsstoffe enthält. Es deutet sich die Korrelation zwischen dem Methylglyoxal Gehalt und der antibakteriellen Wirksamkeit der Honige an. Die anderen getesteten Honige (Tabelle 4.5.4.2-2) sind unter den hier verwendeten Bedingungen nicht antibakteriell wirksam. Die Methylglyoxal-Gehalte liegen bei den entsprechenden Verdünnungen weit unterhalb des MIC-Wertes für Methylglyoxal. Um zu prüfen, ob das antibakterielle Potential der Manuka-Honige ursächlich mit dem Gehalt an Methylglyoxal zusammenhängt, wurde einer 20 %-igen wässrigen Lösung des Honigs 26 (Waldhonig) 1,9 mmol MGO/l (137 mg/l) zudosiert und mittels Lochagardiffusionstest untersucht. Zum Vergleich wurden 20 %-ige wässrige Lösungen des Honigs 44, eine 1,9 mmol/l MGO

Standardlösung und Honig 26 in 20 %-iger Lösung ohne Zusatz von Methylglyoxal mitgeführt (Abbildung 4.5.4.2-3).

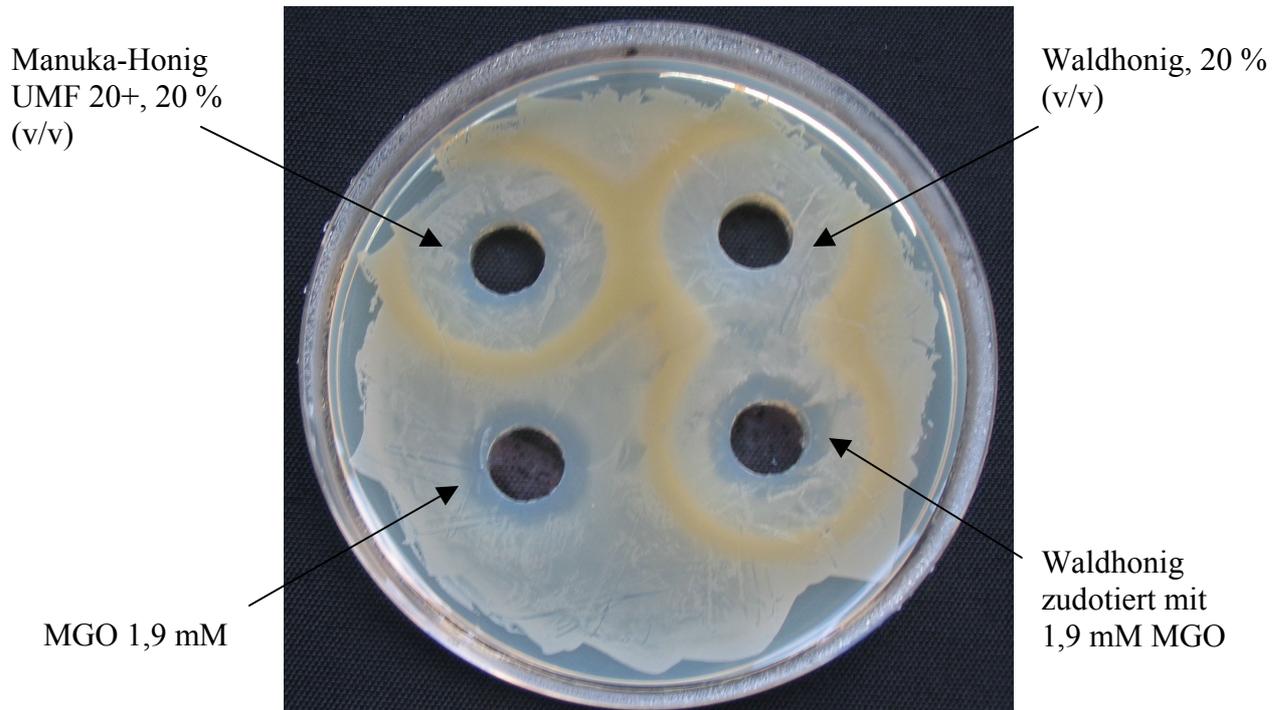


Abbildung 4.5.4.2-3: Lochagardiffusionstest von Methylglyoxal Standard (1,9 mM) (unten links), 20 %-igem Manuka-Honig UMF 20+ (oben links), 20 %-igem Waldhonig (Nr. 26) (oben rechts) und 20 %-igem Waldhonig zudotiert mit 1,9 mmol/l Methylglyoxal (unten rechts) gegen *S. aureus*

In Abbildung 4.5.4.2-3 ist unten links eine eindeutige Hemmung des Wachstums von *S. aureus* durch die 1,9 mmolare wässrige Lösung von Methylglyoxal zu sehen. Klar erkennbar ist der Hemmhof des 20 %-igen Manuka-Honigs UMF 20+ (oben links), der einen Methylglyoxal Gehalt von 1,8 mmol/l bei dieser Verdünnung aufweist. Für Honig 26, der in Vorversuchen als nicht bakterienhemmend eingestuft wurde, ist in der eingesetzten Konzentration kein Hemmhof zu beobachten (oben rechts). Wird nun diesem Honig die Menge an Methylglyoxal zudotiert, die im Manuka-Honig UMF 20+ vorhanden ist, wird klar erkennbar ein Hemmhof gebildet (unten rechts), der vom Durchmesser her vergleichbar ist mit dem Hemmhof des Manuka-Honigs UMF 20+. Durch diese Zudotierung von Methylglyoxal zu einem "inaktiven" Honig konnte gezeigt werden, dass die antibakterielle Wirkung der Manuka-Honige unmittelbar auf den hohen Gehalt an Methylglyoxal zurückzuführen ist.

Wie in Kapitel 2.4.2.4 beschrieben, konnte einigen in Manuka-Honigen vorkommenden phenolischen Verbindungen ein gewisses antibakterielles Potential zugeschrieben werden. Hauptsächlich sind für diese Eigenschaft die Methylsyringa- (60) und Syringasäure (59) verantwortlich. Da aber nach dem Entfernen von phenolischen Verbindungen ein

beträchtliches antibakterielles Potential der Manuka-Honige nachweisbar war, blieb die Frage offen, welche noch in Honig vorhandenen Verbindungen für diese Eigenschaft verantwortlich sein können. Mit dem Nachweis von Methylglyoxal in sehr hohen Konzentrationen von 347 bis 743 mg/ kg und seiner ausgeprägten antibakteriellen Aktivität sowohl in reiner wässrigen Lösung als auch im Honig selbst, ist es gelungen, ein neues, für Manuka-Honige charakteristisches Inhibin zu identifizieren.

4.5.4.3 Konsequenzen des hohen Methylglyoxal-Gehaltes

Methylglyoxal ist eine reaktive, im Laufe der Maillard-Reaktion entstehende 1,2-Dicarbonylverbindung, deren Folgereaktionen bisher einige Arbeitsgruppen untersucht haben (vgl. 2.1.3.2). Methylglyoxal reagiert bevorzugt mit Seitenketten des proteingebundenen Arginin und Lysin und trägt somit zur Bildung von AGEs bei (*Oya et al., 1999; Padival et al., 2003; Nagaraj et al., 1991; Nagaraj et al., 1996; Sell et al., 2005*), die in Verbindung mit Alterungserscheinungen, sowie Krankheiten wie Diabetes mellitus und Urämie gebracht werden (vgl. 2.3.5). Ein Zusammenhang zwischen dem erhöhten Gehalt an Methylglyoxal in Blut und einer Diabetes-Erkrankung konnte in mehreren Untersuchungen festgestellt werden (vgl. Tabelle 2.1.3.2-1). Wie in 2.1.3.3 erläutert, zeigte sich Methylglyoxal in verschiedenen Studien als cytotoxisch (*Nagao et al., 1986; Wieslander et al., 1995; Okabe et al., 2004*), mutagen für *Salmonella typhimurium* und kanzerogen im Versuch mit Ratten (*Nagao et al., 1986*). Auch Glyoxal werden vergleichbare Eigenschaften zugeschrieben.

Da 1,2-Dicarbonylverbindungen ein hohes Reaktionspotential aufweisen und in nahezu in allen Reaktionssystemen, bei denen Kohlenhydrate beteiligt sind, entstehen, wurden Untersuchungen bezüglich der von diesen Verbindungen ausgehenden Cytotoxizität in Peritonealdialyse-Lösungen (PD-Lösungen) vorgenommen (*Wieslander et al., 1995*). In hitzesterilisierten PD-Lösungen (pH 5,5) konnten Gehalte an Methylglyoxal von 28 $\mu\text{mol/l}$ (2 mg/ l) gefunden werden (*Okabe et al., 2004*). Auch andere 1,2-Dicarbonylverbindungen wurden in höheren Konzentrationen als erwartet gemessen (vgl. Tabelle 2.1.3.2-2). Die von *Wieslander et al. (1995)* durchgeführten Tests an Fibroblasten der Mäuse zeigten, dass eine Konzentration an Methylglyoxal von 164 $\mu\text{mol/l}$ (12 mg/ l) notwendig ist, um das Zellwachstum um 50 % herabzusetzen. Diese Konzentration wird in PD-Lösungen nicht erreicht. Bei humanen Mesothelzellen sind ca. 20-fach höhere Konzentrationen an Methylglyoxal notwendig, um einen derart toxischen Effekt zu erzeugen (*Okabe et al., 2004*). Bisher gibt es in der Literatur keine Angaben bezüglich der Resorption, Verstoffwechslung und Wirkung von oral aufgenommenen 1,2-Dicarbonylverbindungen. Dies ist bisher wahrscheinlich nicht von Interesse gewesen, da in Lebensmitteln geringe, und für die

physiologischen Folgen unbedeutende Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen bestimmt wurden (vgl. 2.1.3.1). In den vorhergehenden Untersuchungen gelang es erstmals, für Lebensmittel hohe Gehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen zu bestimmen. 3-Desoxyglucoson konnte in Konzentrationen bis 1100 mg/ kg (*Weigel et al., 2004; Wittmann et al., 2004*) bestimmt werden. *Okabe et al. (2004)* konnten eine Hemmung des Wachstums von humanen Mesothelzellen von 60 % durch eine 46,5 mmolare Lösung (7,5 g/ l) von 3-Desoxyglucosulose messen. Diese Menge an 3-Desoxyglucosulose hat für Lebensmittel aus physiologisch-toxikologischer Sicht unmittelbar keine Bedeutung. Demgegenüber sind jedoch die in Manuka-Honigen bestimmten Konzentrationen an Methylglyoxal von 347 bis 743 mg/ kg nicht zu vernachlässigen. Geht man davon aus, dass ein Teelöffel Honig einer Menge von 21 g Honig entspricht (*National Honey Board*), so nimmt man mit einem Teelöffel Manuka-Honig UMF 10+ bzw. UMF 20+ 7,3 bzw. 15,6 mg Methylglyoxal auf. Im Durchschnitt werden täglich 1,6 bis 2,4 l Magenflüssigkeit produziert (*Ketz et al., 1990*). Bezieht man nun die mit einem Teelöffel Manuka-Honig aufgenommene Menge an Methylglyoxal auf dieses Volumen an Magenflüssigkeit, so errechnen sich die Konzentrationen von 3,0 bis 9,7 mg MGO/ l Magenflüssigkeit. Vergleicht man hiermit die für Maus-Fibroblasten ermittelten ICG 50% Werte für Methylglyoxal (11,8 mg/ l), so wird erkennbar, dass mit nur einem Teelöffel Manuka-Honig UMF 20+ der ICG 50%-Wert beinahe erreicht ist.

In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von Methylglyoxal auf humanen Leukämie Zellen (HL60) untersucht (*Fayad et al., 1993*), wo ein ICG 50 % Wert für Methylglyoxal von $238 \pm 2 \mu\text{mol/ l}$ (17 mg/ l) bestimmt werden konnte. Diese Konzentration an Methylglyoxal (bezogen auf 1 l Magenflüssigkeit) ist mit der Aufnahme von zwei Teelöffel Manuka-Honig UMF 20+ erreicht.

Über die Wirkung von Methylglyoxal auf die gesunden humanen Zellen gibt es in der Literatur bisher keine Angaben. Man kann daher nur sagen, dass ein cytotoxisches Potential ausgehend von Manuka-Honigen in den verzehrsüblichen Mengen zu erwarten ist. In wieweit dies im Körper zu zellulären Reaktionen führt, ist noch zu prüfen.

Manuka-Honige finden aufgrund von ihren ausgeprägten antibakteriellen Eigenschaften die Anwendung in der Medizin zur Behandlung von Halsschmerzen, Verdauungsbeschwerden oder zur Wundheilung (www.kiwi-line.de, www.epharmacy.com.au). Schon in einem Teelöffel Manuka-Honig UMF 20+ pur sind 15,6 mg Methylglyoxal enthalten, was einer zweifachen Menge des MIC-Wertes (0,075 mg/ kg) entspricht. In der praktischen Anwendung bedeutet dies, dass mit Manuka-Honig die Entzündungen der Haut oder der Schleimhäute verursacht durch *S. aureus* erfolgreich behandelt werden können.

5 Zusammenfassung

Reaktion von Arginin mit Abbauprodukten 1,4-verknüpfter Disaccharide

1 Im Verlauf der Reaktion von Arginin mit Abbauprodukten 1,4-glycosidisch verknüpfter Disaccharide entsteht ein Hauptderivatisierungsprodukt des Arginins, welches aus Inkubationsansätzen von Lactose mit N-(tert-Butoxycarbonyl)-L-arginin (Boc-Arg) bzw. N- α -Hippuryl-L-arginin (Hip-Arg) isoliert und als N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxoimidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) identifiziert werden konnte. Da es sich hierbei um ein neues, bisher in der Literatur nicht beschriebenes Derivatisierungsprodukt des Arginins handelt, wurden Versuche vorgenommen, den Bildungsmechanismus von PIO aufzuklären. In Inkubationsansätzen von N- α -Hippuryl-L-arginin mit Lactose, Maltose, Lactulose, Glucose und Raffinose konnte gezeigt werden, dass PIO spezifisch für die Reaktion von Arginin mit Abbauprodukten 1,4-glycosidisch verknüpfter Disaccharide ist.

2 Zum Nachweis des Precursors von PIO wurden die Bildung und der Abbau von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Inkubationsansätzen von Lactose mit und ohne Hip-Arg nach der Hitzebehandlung mit o-Phenylendiamin untersucht. Es konnten sowohl bei Vorhandensein als auch in Abwesenheit von Hip-Arg Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), 3-Desoxyglucoson (3-DG) und 3-Desoxypentosulose (3-DPs) identifiziert werden. Jedoch zeigte sich, dass ein als 1,2-Dicarbonylverbindung identifiziertes Abbauprodukt von Lactose, welches keinem der vorhandenen Standards zugeordnet werden konnte, nur in Abwesenheit von der Aminokomponente (Hip-Arg) als Hauptabbauprodukt bestimmbar war. Nach Isolierung dieser 1,2-Dicarbonylverbindung in Form ihres stabilen Chinoxalin-Derivates mittels semi-präparativer RP-HPLC und der Strukturaufklärung durch LC-MS und 1D- und 2D-NMR ist es gelungen, dieses Hauptabbauprodukt der Lactose als (3'-Hydroxypropyl)-chinoxalin also das Chinoxalin der 3,4-Didesoxypentosulose (3,4-DDPs) zu identifizieren. 3,4-Didesoxypentosulose ist ein neues, bisher in der Literatur nicht beschriebenes Abbauprodukt von Lactose. Die Bildung von 3,4-Didesoxypentosulose erfolgt spezifisch aus 1,4-glycosidisch verknüpften Disacchariden. Die Umsetzung von 3,4-Didesoxypentosulose mit Boc-Arg bzw. Hip-Arg resultierte in der Bildung von Boc-PIO bzw. Hip-PIO. So konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass 3,4-Didesoxypentosulose der direkte Precursor von PIO ist.

3 Zur Bestimmung von PIO in Lebensmitteln wurde der Abbau von Arginin und die Bildung von PIO nach enzymatischer bzw. nach Säurehydrolyse untersucht. PIO wird während der

enzymatischen Hydrolyse selbst nicht abgebaut, so dass dadurch die Möglichkeit gegeben ist, PIO nach enzymatischer Hydrolyse in Lebensmitteln zu bestimmen. Jedoch konnten im Rahmen dieser Arbeit keine eindeutigen Beweise über die Freisetzung von PIO aus dem Proteinverband nach enzymatischer Hydrolyse erbracht werden.

4 Während der Säurehydrolyse wird PIO zu Hydrolyseprodukten abgebaut, die mit A, B und C bezeichnet wurden. Das mit B bezeichnete Abbauprodukt von PIO wurde mittels semi-präparativer Ionenaustauschchromatographie isoliert und als Ornithin identifiziert. PIO wird unter Standardbedingungen (6N HCl, 23 h, 110 °C) zu ca. 26 % zu Ornithin abgebaut. Über die Bestimmung von Ornithin nach Säurehydrolyse kann damit auf den Gehalt an PIO geschlossen werden.

Bestimmung von α -Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln

1 Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), 3-Desoxyglucosulose (3-DG) und 3-Desoxypentosulose (3-DPs) konnten nach Umsetzung mit o-Phenylendiamin und optimierter Probenaufarbeitung erstmal in Milch- und Milchprodukten quantifiziert werden. Für Glyoxal wurden Gehalte von 0,06 bis 3,5 mg/ l und für Methylglyoxal von 0,2 bis 4,7 mg/ l bestimmt. 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose waren im Gegensatz zu Glyoxal und Methylglyoxal in den meisten Proben nachweisbar. 3-Desoxyglucosulose wurde mit Gehalten von 0,7 bis 3,5 mg/ l und 3-Desoxypentosulose von 0,1 bis 4,7 mg/ l bestimmt.

2 Die Bestimmung von Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose erfolgte in käuflich erworbenen deutschen Honigen, in Honigen des Imkerverbandes Dresden und in neuseeländischen Honigen. Im Vergleich zu den Milchprodukten wurden deutlich höhere Gesamtgehalte an 1,2-Dicarbonylverbindungen (124 bis 1550 mg/ kg) bestimmt. Für 3-Desoxyglucosulose wurden 119 bis 1451 mg/ kg, für Glyoxal 0,2 bis 4,6 mg/ kg und für Methylglyoxal 0,5 bis 743 mg/ kg ermittelt.

3 Neuseeländische Manuka-Honige (Manuka: *Leptospermum scoparium*, Teebaum) sind für ihre ausgeprägten antibakteriellen Eigenschaften bekannt. Für kommerziell erhältliche Proben konnten ungewöhnlich hohe Gehalte an Methylglyoxal bestimmt werden (von 347 bis 743 mg/ kg). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der antibakteriellen Aktivität und den messbaren Gehalten an Methylglyoxal besteht. Die Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität der 1,2-Dicarbonylverbindungen wurden

mittels Lochagardiffusionstest gegen *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) durchgeführt. 3-Desoxyglucosulose sowie 5-Hydroxymethylfurfural zeigten in zehnfach höheren Konzentrationen als in Honig vorkommend kein antibakterielles Potential. Dagegen waren Glyoxal und Methylglyoxal mit MIC-Werten (minimal inhibitory concentration) gegen *E. coli* von 6,9 mmol/ l für Glyoxal und 1,05 mmol/ l für Methylglyoxal, sowie gegen *S. aureus* mit 4,3 mmol/ l für Glyoxal und 1,05 mmol/ l für Methylglyoxal stark antimikrobiell wirksam.

4 Von 12 verschiedenen Honigen deutscher und neuseeländischer Herkunft wurden nur Manuka-Honige als antibakteriell wirksam eingestuft. Bezogen auf den Gehalt an Methylglyoxal liegen die MIC-Werte für *S. aureus* bei 1,5 mmol/ l für Manuka-Honig (35 % v/v), 1,4 mmol/ l für Manuka-Honig "active" (30 % v/v), 1,1 mmol/ l für Manuka-Honig UMF 10+ (25 % v/v) bzw. 1,8 mmol/ l für Manuka-Honig UMF 20+ (20 % v/v). Es zeigte sich, dass die antibakterielle Aktivität des Honigs unmittelbar auf den Methylglyoxal-Gehalt zurückführbar war. Einen eindeutigen Nachweis der antibakteriellen Wirkung des Honigs basierend auf hohem Methylglyoxal-Gehalt ergab die Zudotierung von 1,05 mmol MGO/ l zu einem antibakteriell nicht wirksamen Honig. Der MIC-Wert dieses mit MGO dotierten Honigs entsprach dem MIC-Wert des MGO-Standards. Hiermit galt als erwiesen, dass Methylglyoxal ein für Manuka-Honige spezifisches Inhibin darstellt.

6 Ausblick

N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO) ist in disaccharidhaltigen Lebensmitteln wahrscheinlich das wichtigste Derivat des Arginins, welches als Erhitzungs- und Qualitätsparameter zur Beurteilung von Lebensmitteln herangezogen werden kann. Hierzu muss der Gehalt von proteingebundenem PIO bestimmt werden. In den weiterführenden Arbeiten sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob PIO mittels enzymatischer Hydrolyse aus dem Proteinverband freigesetzt wird und so nachfolgernd quantifiziert werden kann.

Da es im Rahmen dieser Arbeit gelang, ein Säurehydrolyseprodukt von PIO als Ornithin zu identifizieren, könnte die Bildung von Ornithin aus weiteren Argininderivaten nach Säurehydrolyse untersucht werden. Möglicherweise ist das nach Säurehydrolyse bestimmbare Ornithin ein universeller Indikator für die während der Maillard-Reaktion stattfindende Argininderivatisierung.

Ein weiteres Säurehydrolyseprodukt von PIO, welches als "A" bezeichnet wurde, scheint aus quantitativer Sicht von Bedeutung zu sein, und ist wahrscheinlich in Lebensmitteln nachweisbar. Ziel weiterer Untersuchungen könnte daher die Isolierung und Strukturaufklärung von "A" und dessen Nachweis in Säurehydrolysaten von Lebensmitteln sein.

Bei der Untersuchung von Honigen hinsichtlich des Gehaltes an 1,2-Dicarbonylverbindungen konnten unerwartet hohe Gehalte an Methylglyoxal in neuseeländischen Manuka-Honigen ermittelt werden. Die mikrobiologische Untersuchungen mittels Lochgardiffusionstest sollten mit einer weiteren Bestimmungsmethode, wie z.B. Trübiditystest bestätigt werden. Da es bekannt ist, dass Methylglyoxal nicht nur antibakteriell, sondern auch cytotoxisch wirkt, ist es weiterhin von Bedeutung, Honige auf ihre Cytotoxizität im Zusammenhang mit dem Methylglyoxal- bzw. 1,2-Dicarbonylgehalt zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Adachi, S. (1959) The mechanism of the degradation of lactose in heated milk. *Intern. Dairy Congr. Proc.*, **3**, 1686-1691
- Adachi, S., Nakanishi, T. (1958) Amino-carbonyl reaction of milk products. XVI. Mechanism of degradation of lactose. 1. Isolation and identification of galactose and lactulose in highly heated milk. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **32**, 309-313
- Adcock, D. (1962) The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *J. Apic. Res.*, **1**, 38-40.
- Al-Jassabi, S. (2004) Effect of methylglyoxal an antioxidant enzymes of the liver and spleen of the mice, *J. Biol. Sci.*, **4**, 605-608
- Allen, K., L., Molan, P., C., Reid, G., M. (1991) A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 817-822
- Allen, K., L., Hutchinson, G., Molan, P., C. (2000) The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. First World Wound Healing Congress (<http://bio.waikato.ac.nz/pdfs/honeyresearch/potential.pdf>)
- Ames, J., Guy, R., C., E., Kipping, G., J. (2001) Effect of pH and temperature on the formation of volatile compounds in cysteine/ reducing sugar/ starch mixtures during extrusion cooking. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1885-1894
- Anet, E., F., L., J. (1960) 3-Deoxyosones. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1502-1502
- Arena, M., E., Manca de Nadra, M., C. (2002) Comparative survey in *Lactobacillus plantarum* of the growth and metabolism of arginine and citrulline in different media. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 6497-6500
- Barros, A., Rodrigues, J. A., Almeida, P. J., Oliva-Teles, M. T. (1999) Determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in selected beer and wine by HPLC with UV spectrometric detection after derivatization with o-phenyldiamine. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, **22**, 2061-2069
- Beck, J., Ledl, F., Severin, T. (1989) Formation of glucosyl-deoxy-osones from Amadori compounds of maltose. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **188**, 118- 121
- Beisswenger, P., J., Howell, S., K., Touchette, A., D., Lal, S., Szwergold, B., S. (1999) Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 Diabetes. *Diabetes*, **48**, 198-202
- Beisswenger, P., J., Howell, S., K., O'Dell, R., M., Wood, M., E., Touchette, A., D., Szwergold, B., S. (2001) α -Dicarbonyls increase in the postprandial period and reflect the degree of hyperglycemia. *Diabetes Care*, **24**, 726-732
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2001). Lehrbuch der Lebensmittelchemie. 5.Aufl., Springer Verlag, Berlin
- Berg, H., E. (1993) Reactions of lactose during heat treatment of milk: a quantitative study. *Dissertation*, Universität Wageningen, Niederlande

- Biemel, K., M., Reihl, O., Conrad, J., M., O. (2001) Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 23405-23412
- Biemel, K., M., Conrad, J., Lederer, M., O. (2002) Unexpected carbonyl mobility in aminoketoses: the key to major Maillard crosslinks. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 801-804
- Biemel, K., M., Friedl, A., D., Lederer, M., O. (2002) Identification and quantification of major Maillard cross-links in human serum albumin and lens protein. *J. Biol. Chem.*, **277**, 24907-24915
- Biswas, S., Ray, M., Misra, S., Dutta, D., P., Ray, S. (1997) Selective inhibition of mitochondrial respiration and glycolysis in human leukemic leucocytes by methylglyoxal. *Biochem. J.*, **323**, 343-348
- Bogdanov, S. (1997) Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Food Sci. Technol.*, **30**, 748-753
- Bogdanov, S. (1999). Honig. *Schweiz. Lebensmittelbuch*, **29**, 1-43
<http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/authenticityreview.pdf>
- Bogdanov, S., Blumer, P. (2001) Natürliche antibiotische Eigenschaften des Honigs. *Schweiz. Bienen-Zeitung*, **124**, 18-21
- Brands, C., M., J., van Boekel, M., A., J., S. (2001) Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: building of a reaction network model. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 4667-4675
- Charlesworth, E.H., Giesinger A. (1956) Reactions of some halogen derivatives of tetrahydropyran-2-ol. *Can. J. Chem.*, **34**, 376-382
- Claeys, W., L., Smout, C., Loey A., M., Hendrickx, M., E. (2004) From time temperature integrator kinetics to time temperature integrator tolerance levels: heat-treated milk. *Biotechnol. Prog.*, **20**, 1-12
- Cooper, R., A., Molan, P., C., Harding, K., G. (2002) The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 857-863
- Corbett, W., M., Kenner, J. (1953) The degradation of carbohydrates by alkali. II. Lactose. *J. Chem. Soc.*, **52**, 2245-2247
- Deifel, A., (1989). Die Chemie des Honigs. *Chemie in unserer Zeit*, **23**, 25-33
- Dold, D., Du, D., H., Dziao, S., T. (1937) Nachweis antibakterieller, hitze- und lichtempfindlicher Hemmstoffe (Inhibine) im Naturhonig (Blütenhonig). *Z. Hyg. Infekt.*, **120**, 155-167
- Dustmann, J., H. (1972) Über den Einfluß des Lichtes auf den Peroxidwert (Inhibin) des Honigs. *Z. Lebensm. Unter. Forsch.*, **148**, 263-268
- Dyer, D., G., Blackledge, J., A., Thorpe, S., Baynes, J., W. (1991) Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11654-11660

- Eversberg, I. (2005) Einsatz von EZ:faast zur Bestimmung von Asparagin und Histamin in Lebensmitteln, *Diplomarbeit*, TU Dresden
- Fayad, A., M., Rosamund, A., E., Thornalley, P., J. (1993) Inhibition of proliferation of human leukaemia 60 cells by methylglyoxal *in vitro*. *Leukemia Res.*, **17**, 397- 401
- Glomb, M., A., Lang, G. (1997) Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1493-1501
- Glomb, M., A., Pfahler, C. (2000) Synthesis of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose, a major hexose Maillard intermediate. *Carbohydr. Res.*, **329**, 515-523
- Glomb, M., A., Rösch, D., Nagaraj, R., H. (2001) N- δ -(5-Hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine-2-yl)-L-ornithine, a novel methylglyoxal-arginine modification in beer. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 366-372
- Hayase, F., Koyama, T., Konishi, Y. (1997) Novel dehydrofuroimidazole compounds formed by the advanced Maillard reaction of 3-deoxy-D-hexos-2-ulose and arginine residues in proteins. *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 1137-1143
- Hayashi, T., Shibamoto, T. (1985) Analysis of methylglyoxal on foods and beverages. *J. Agric Food Chem.*, **33**, 1090-1093.
- Henle, T., Walter, H., Klostermeyer, H. (1991) Evaluation of the extent of the early Maillard-reaction in milk products by direct measurement of the Amadori-product lactuloselysine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **193**, 119-122
- Henle, T. Walter, A., W., Haeßner, R., Klostermeyer, H. (1994) Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **199**, 55-58
- Henle, T., Bachmann, A. (1996) Synthesis of pyrrolidine 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
- Höche, F. (2004) Präklinische Validierung von L-Ornithin HCl für die topische Applikation. *Dissertation*. Technische Universität Halle-Wittenberg
- Hofmann, T. (1998) Acetylformoin- a chemical switch in the formation of coloured Maillard reaction products from hexoses and primary and secondary amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3918-1928
- Hollnagel, A., Kroh, L., W. (2000) Degradation of oligosaccharides in nonenzymatic browning by formation of α -dicarbonyl compounds via a "peeling off" mechanism. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 6219-6226
- Hollnagel, A., Kroh, W., L. (2002) 3-Deoxypentosulose: an α -dicarbonyl compound predominating in nonenzymatic browning of oligosaccharides an aqueous solution. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1659-1664

- Hollnagel, A. (2000) Beiträge zur Chemie der nichtenzymatischen Bräunung von oligomeren Kohlenhydraten. *Dissertation*, Technische Universität Berlin
- Hodge, J., E. (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **1**, 928-943
- Hušek, P. (1991) Amino acid derivatization and analysis in five minutes. *FEBS Letters*, **280**, 354-356
- Ishikawa, N., Miyata, T., Ueda, Y., Inagi, R., Izuhara, Y., Yuzawa, H., Onogi, H., Nishina, M., Nangaku, M., de Strihou, C., Y., Kurokawa, K. (2003) Affinity adsorption of glucose degradation products improves the biocompatibility of conventional peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int.*, **63**, 331-339
- Kato, Y., Matsuda, T., Kato, N., Nakamura, R. (1989) Maillard reaction of disaccharides with protein: suppressive effect of nonreducing end pyranoside groups on browning and protein. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1077-1081
- Ketz, H., A., Wolfram, G. (1990) Grundriß der Ernährungslehre. 3. Aufl., Steinkopff, Darmstadt
- Kim, M., Baltes, W. (1996) On the role of 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(h)-pyran-4-one in the Maillard Reaction. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 282-289
- King, T., P. (1966) Selective chemical modification of arginyl residues. *Biochemistry*, **5**, 3454-3459
- Kramhöller, B., Ledl, F., Lerche, H., Severin, T. (1992) HPLC separation of some characteristic components in reaction mixtures of disaccharides with amines- model systems for milk and cereal products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, 431-433
- 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. 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., W., Schulz, A. (2001) News on the Maillard reaction of oligomeric carbohydrates: a survey. *Nahrung*, **45**, 160-163
- Kumpf, Y. (2003) Studien zur Argininderivatisierung und zum Lactoseabbau in Milchprodukten, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Lapolla, A., Flamini, R., Vedova, A., D., Senesi, A., Reitano, R., Fedele, D., Basso, E., Seraglia, R., Traldi, P. (2003) Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/ MS Method. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 1166-1173
- Lederer, M., Gerum, F., Severin, T. (1998) Cross-linking of proteins by Maillard processes- model reactions of D- glucose or methylglyoxal with butylamine and guanidine derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, **6**, 993-1002

- Lederer, M., 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., 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., Ellrich, G., Klostermeyer, H. (1986) Detection and identification of a new Maillard compound in heated milk. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **182**, 19-24
- Ledl, F., Schleicher, E. (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper-neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chemie*, **102**, 597-734
- Liedke, R. (1999) Bildung von α -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori Umlagerungsprodukten. *Dissertation*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Lo, T., W., C., Westwood, M., E., McLellan, A., C., Selwood, T., Thornalley, P., J. (1994) Binding modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, **269**, 32299-32305
- Lodge-Ivey, L., S., May, T., Petersen, M., K., Strickland, J., R. (2004) Determination of Methylglyoxal in ruminal fluid by high-performance liquid chromatography using flourimetric detection. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6875-6878
- Madson, M., A., Feather, M., S. (1981) An improved preparation of 3-deoxy-erythro-hexos-2-ulose via the bis(benzylhydrazone) and some related constitutional studies. *Carbohydr. Res.*, **9**, 183-191
- Marconi, E., Caboni, F., M., Messia, M., C., Panfili, G. (2002) Furosine: a suitable marker for assessing the freshness of royal jelly. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2825-2829
- Marko, D., Habermeyer, M., Kemény, 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
- Mavric, E., Kumpf, Y., Schuster, K., Kappenstein, O., Scheller, D., Henle, T. (2004) A new imidazolinone resulting from the reaction of peptide-bound arginine and oligosaccharides with 1,4-glycosidic linkages. *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 213-218
- Mavric, E., Henle, T. (2004) A new pathway of lactose degradation and arginine derivatization in milk. *Czech J. Food Sci.*, **22**, 93-95
- McLellan, A. C., Phillips, S. A., Thornally, P.J. (1992) The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-Diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal. Biochem.*, **206**, 17-23
- Mecham, D., K., Olcott, H., S. (1947) Effect of dry heat on proteins. *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 1023-1027

- Mendoza, M., R., Olano, A., Villamil, M. (2002) Furosine as indicator of Maillard-Reaction in jams and fruit-based infant foods. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4141-4145
- Mohammad, A., Fraenkel- Conrat, H., Olcott, H., S. (1949) The browning reaction of proteins with glucose. *Arch. Biochem.*, **24**, 157-178
- Molan, P. C. (1992a). The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, **73**, 5-28
- Molan, P., C., Allen, K., L. (1996) The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. *J. Pharm. Pharmacol.*, **48**, 1206-1209
- Molan, P., C. (2001) Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected Wounds. *World Wide Wounds*
www.worldwidewounds.com/2001/november/Molan/honey-as-topical-agent.html
- Molan, P., C. (2001) Manuka honey as medicine.
<http://bio.waikato.ac.nz/honey/bioactives.shtml>
- Morales, F., Romero, C., Pérez, J., S. (1997) Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index of milk protein glycosylation. *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1570-1573
- Morales, F., J., Peréz, J., S. (1998) Study of hydroxymethylfurfural formation from acid degradation of the amadori product in milk-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 3885-3890
- Morales, F., Arnoldi, A. (1999) Analysis of galactosylisomaltol in milk systems using HPLC. *Food Chem.*, **67**, 185-191
- Moreno, F., J., Villamer, M., Olano, A.. (2003) Effect of high pressure on isomerization and degradation of lactose in alkaline media. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1894-1896
- Nagaraj, R., H., Sell, D., R., Prabhakaram, M., Ortwert, B., J., Monnier, V., M. (1991) High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10257-10261
- Nagaraj, R., H., Shipanova, I., N., Faust, F., M. (1996) Protein cross-linking by the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.*, **271**, 19338-19345
- Nagao, M., Fujita, Y., Sugimura, T. (1986) Methylglyoxal in beverages and foods: its mutagenicity and carcinogenicity. *IARC Sci. Publ.*, **70**, 283-291
- Nedvidek, W., Ledl, F., Fischer, P. (1992) Detection of 5-hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanone and of α -dicarbonyl compounds in reaction mixtures of hexoses and pentoses with different amines. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **194**, 222-228
- Niwa, T. (1999) 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity and clinical implication. *J. Chromatogr. B*, **731**, 23-36

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 Letters*, **427**, 381-385

Ohmori, S., Kawase, M., Mori, M., Takahashi, H. (1987) Simple and sensitive determination of methylglyoxal in biological samples by gas-chromatography with electron-capture detection. *J. Chromatogr.*, **415**, 221-229

Okabe E., Tadashi, T., Kazuhito, T., Hiroshi, K., Jyun-ichi, K., Masaru, N. (2004) Synergistic cytotoxicity of acidity and glucose degradations products in peritoneal dialysis fluid. *J. Artif. Organs*, **7**, 155-160

Okado-Mastumoto, A., Fridowich, I. (2000) The role of α,β -dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J. Biol. Chem.* **275**, 34853-34857

Oya, T, Hattori, N., Mizuno, Y., Miyata, S., Maeda, S., Osawa, T., Uchida, K. (1999) Methylglyoxal modification of protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 18492-18502

Padayati, P., S., Alan, S., Uchida, K., Glomb, M., A., Nagaraj, R., H. (2001) Argpyrimidine is present in the human lens and accumulates in high levels in brunescant cataractous lenses. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 1-6

Padival, A., K., Crabb, J., W., Nagaraj, R., H. (2003) Methylglyoxal modifies heat shock protein 27 in glomerular mesangial cells. *FEBS Lett.*, **551**, 113-118

Patthy, L., Smith, E., L. (1974) Reversible modification of arginine residues. *J. Biol. Chem.*, **250**, 557-564

Patthy, L., Smith, E., L. (1974a) Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **250**, 565-569

Pellegrino, L., Cattaneo, S. (2001) Occurrence of galactosyl isomaltol and galactosyl β -pyranone in commercial drinking milk. *Nahrung*, **45**, 195-200

Pischetsrieder, M., Schoetter, C., Severin, T. (1998) Formation of an Aminoreductone during the Maillard Reaction of lactose with N- α -acetyllysine or proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 928-931

Portero-Otin, M., Nagaraj, R., H., Monnier, V., M., (1995) Chromatographic evidence for pyrraline formation during protein glycation in vitro and in vivo. *Biochim. Biophys. Acta*, **1247**, 74-80

Qian, M., Reineccius, G. (2002) Identification of aroma compounds in Parmigiano-Reggiano cheese by gas chromatography/ olfactometry. *J. Dairy Sci.*, **85**, 1362-1369

Radwan, S. S., El-Essawy, A. A., Sarhan, M. M. (1984). Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against microorganisms. *Zbl. Mikrobiol.*, **139**, 249-255

Rättich, S. (2004) Bestimmung von α -Dicarbonylen in Milchprodukten, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden

- Reihl, O., Biemel, K., M., Eipper, W., Lederer, M., O., Schwack, W. (2003) Spiro cross-links: representatives of a new class of glycooxidation products. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4810-4818
- Renner, E. (1988) Review article: Storage stability and some nutritional aspects of milk powders and ultra high temperature products at high ambient temperatures. *J. Dairy Res.*, **55**, 125-142
- De Revel, G., Bertrrand, A. (1993) A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric.*, **61**, 267-171
- Riordan, J., F. (1973) Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione. *Biochem.*, **12**, 3915-3923
- Rodrigues, J. A., Barros, A. A., Rodrigues, P. G. (1999) Differential pulse polarographic determination of α -dicarbonyl compounds in foodstuffs after derivatization with o-phenyldiamine. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3219-3222
- Römpp, H. (1997) Römpp Lexikon, Thieme, Stuttgart
- Rudolph, N. (2005) Identifizierung und Quantifizierung von PIO-Abbauprodukten in Lebensmitteln. *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Russell, K., M., Molan, P., C., Wilkins, A., L., Holland, P., T. (1990) Identification of some antibacterial constituents of New Zealand manuka honey. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 10-13
- Sackett, W., G. (1919) Honey as a carrier of intestinal diseases. *Bull. Colorado State Univ. Agric. Exp. Station*, **252**, 28
- Sato, J., Wang, Y., van Eys, J. (1980) Methylglyoxal formation in rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, **255**, 2046-2050
- Scheparz, A., I., Subers, M., H. (1966) Catalase in honey. *J. Apicult. Res.*, **5**, 37-43
- Schieberle, P. (1992) Formation of Furaneol in heat-processed foods. *ACS Symp. Ser.*, **490** (Flavour precursors), 164-174
- Schuster, C. (2005) Isolierung, Identifizierung und Quantifizierung proteingebundener Argininderivate in Lebensmitteln, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- Schuster, K., Scheller, D., Henle, T. (2000) A new type of arginine modification. *Czech. J. Food Sci.*, **18**, 48-49
- Schwarzenbolz, U., Henle, T., Haeßner, R., Klostermeyer, H. (1997) On the reaction of glyoxal with proteins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **205**, 121-124
- Sell, D., R., Biemel, K., M., Reihl, O., Lederer, M., O., Strauch, C., M., Monnier, V., M. (2005) Glucosepane is a major protein cross-link senescent human cellular matrix. Relationship with diabetes. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12310-12315
- 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. (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **264**, 21597-21602
- Senser, F., Scherz, H. (1991) Der kleine Souci-Fachmann-Kraut, Lebensmitteltabelle für die Praxis, wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart
- Shangari, N., O'Brien, P., J. (2004) The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 1433-1442
- Shipanova, I., Glomb, M., A., Nagaraj, R., H. (1997) Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.*, **344**, 29-36
- Siegl, T. (2003) Studien zur Quervernetzung von Milch Proteinen und zur Bildung individueller Crosslink- Aminosäuren, *Dissertation*, Technische Universität Dresden
- Silva, M., B., Casal, S., Andrade, P., B., Saeber, R., Oliveira, M., B., P., P., Ferreira, M., A. (2004) Free amino acid composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp and peel) and Jam. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 1201-1206
- Snow, M., J., Harris- Manley, M. (2004) On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chem.*, **84**, 145-147
- Sopio, R., Lederer, M. (1995) Reaction of 3-deoxypentosulose with N-methyl and N,N-dimethylguanidine as model reagents for protein-bound arginine and for creatine. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **201**, 381-386
- Suortti, T., Mälkki, Y. (1984) Antimicrobial activities of heated glucose and fructose solutions and their elucidation by high performance liquid chromatography. *Food Chem.*, **15**, 165-173
- Taborda, G., Molina, E., Martínez-Castro, I., Ramos, M., Amigo, L. (2003) Composition of the water-soluble fraction of different cheeses. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 270-276
- Takahashi, K. (1968) The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.*, **243**, 6171-6179
- Thornalley, P., J. (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Mol. Aspects Med.*, **14**, 287-371
- Toi, K., Bynum, E., Norris, E., Itano, H., A. (1966) Studies on the chemical modification of arginine. *J. Biol. Chem.*, **242**, 1036-1043
- Tonks, A., J., Cooper, R., A., Jones, K., P., Blair, S., Parton, J., Tonks, A. (2003) Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, **21**, 242-247
- Tressl, R., Wondrak, G., T., Garbe, L., A., (1998) Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1765-1776

- Troyano, E., Olano, A., Jimeno, M., L., Sanz, J., Martinez-Castro, I., (1992) Isolation and characterization of 3-deoxypentulose and its determination in heated milk. *J. Dairy Res.*, **59**, 507-515
- Troyano, E., Olano, A., Martinez-Castro, I., (1994) Changes in free monosaccharides during storage of dried milk. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 1543-1545
- Troyano, E., Villamiel, M., Olano, A., Sanz, J., Martinez-Castro, I. (1996) Monosaccharides and myo-inositol in commercial milks. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 815-817
- 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
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, J., K., Verachtert, H., Derdelinckx, G., (2003) Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 6782-6790
- Weigel, K., Opitz, T., Henle, T., (2004) Studies on occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey. *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 147-15
- Weenen, H. (1998) Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.*, **62**, 393-401
- Wells-Knecht, K., J., Zyzak, D., V., Lichtfield, J., E., Thorpe, S., Baynes, J., W. (1995) Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochem.*, **34**, 3702-3709
- Weston, R., J., Mitchell, R., K., Allen, K., L. (1999) Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chem.*, **64**, 295-301
- Whistler, R., L., Medcalf, D., G. (1962) Alkaline degradation of lactose in liquid ammonia. *J. Org. Chem.*, **27**, 3560-3562
- White, J., W., Jr., Subers, M., Schepartz, A., I. (1962) The identification of inhibine. *Amer. Bee J.*, **102**, 430-431
- White, J., W., Jr., Subers, M., H. (1963) Studies on honey inhibine. 2. A chemical assay. *J. Apicult. Res.*, **3**, 93-100
- White, J., W., Jr., Subers, M., H. (1964) Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat. *J. Apicult. Res.*, **3**, 45-50
- White, J., Kushnir, I., Subers, M. (1964) Effects of storage and processing temperatures on honey quality. *Food Technol.*, **18**, 153-156
- White, J., W. (1978) Honey. *Adv. Food Res.*, **24**, 287-351
- Wieslander, A., P., Andrén, A., H., G., Nilsson-Thorell, C., Muscalu, N., Kjellstrand, P., T., T., Rippe, B. (1995) Are aldehydes in heat-sterilized peritoneal dialysis fluids toxic in vitro?. *Perit. Dial. Int.*, **15**, 348-352

- Wieslander, A., P., Nordin, M., K., Kjellstrand, P., T., T., Boberg, U., C. (1991) Toxicity of peritoneal dialysis fluids on cultured fibroblasts, L-929. *Kidney Int.*, **40**, 77-79
- Willix, D., J., Molan, P., C., Harfoot, C., J. (1992) A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. *J. Applied Bacteriol.*, **73**, 388-394
- Wittmann, S., (2004) Antibakterielle und cytotoxische Wirkung von α -Dicarbynylen in Honigen, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden
- 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
- Yamaguchi, M., Ishida, J., Xuan-Xuan, Z., Nakamura, M., Yoshitake, T. (1994) Determination of glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, and 2,3-pentanedione in fermented foods by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom.*, **17**, 203-211
- Yankeelov, J., A., Mitchell, C., D. (1968) A simple trimerization of 2,3-butanedione yielding a selective reagent for the modification of arginine in proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1664-1666
- Yankeelov, J., A. (1970) Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. *Biochemistry*, **9**, No. 12, 2433-2439
- Yaylayan, V., A., Machiels, D., Istasse, L. (2003) Thermal decomposition of specifically phosphorylated D-glucoses and their role in the control of the Maillard reaction, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 3358-3366
- Zhao, C., Giusti, M., M., Malik, M., Moyer, M., P., Manguson, B., A. (2004) Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 6122-6128

8 Anhang

8.1 Parameter für flüssigchromatographisch-massenspektroskopische Untersuchungen

8.1.1 Geräteeinstellung für die Bestimmung von Hippurylderivaten

Mariner System State

Instrument State	ON
Ion Polarity	POS
Auxillary Gas	ON
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0322062E-007
Calibration Constant B	66.162596
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	5492.58
SCIEX Heater	280.03

API Interface Settings

Nozzle Potential	90.09
Skimmer 1 Potential	11.01
Quadrupole DC Potential	7.01
Deflection Voltage	-1.00
Einzel Lens Potential	-32.01
Quadrupole RF Voltage	799.07
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	140.01

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	585.00
Pull Pulse Potential	204.97
Pull Bias Potential	3.00
Acceleration Potential	3999.94
Reflector Potential	1549.99
Detector Voltage	2050.26

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	100.00
Last Mass	1000.00
Accumulate Spectra	OFF
Standby at End of Acquisition	OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra OFF

System Settings

Gas Control Mode Manual
 Syringe Pump Mode Manual
 Syringe Pump Rate 20.00
 Syringe Diameter 1.46
 Min Analyzer Mass 40.00
 Max Analyzer Mass 4000.00

LC Settings

Pump Run Time(min) 27.00
 Pump Post Time(min) 12.00
 Pump Type BINARY WITH SSV
 Pump Flow Rate(mL/min) 0.80
 Pump Flow Ramp(mL/min * min) 1.00
 High Pressure(bar) 300.00
 Low Pressure(bar) 0.00
 Solvent Channel A 1
 Solvent Channel B 1
 Solvent Comp. A(%) 95
 Solvent Comp. B(%) 5

Time	Comp-A	Comp-B	Flow Rate	EC1	EC2	EC3	EC4
0.00	95.0	5.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
2.00	95.0	5.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
17.00	75.0	25.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
22.00	50.0	50.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
27.00	0.0	100.0	0.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore
29.00	0.0	100.0	0.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore
31.00	95.0	5.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
39.00	95.0	5.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore

Wash Vial # 11
 Default Injection Volume(μL) 50.00
 Eject Speed(μL) 200
 Draw Position(mm) 0.00
 Draw Speed(μL) 200
 Thermo Temp. OFF
 Left Column Temp. 30.00
 Right Column Temp. SAME AS LEFT
 Column Ready at ANY TEMPERATURE
 DA Detector Balance (Prerun) ON
 DA Detector Balance (Postrun) OFF
 UV Lamp Required ON
 VIS Lamp Required OFF
 Peak Width > 0.05 min (1 s)
 Negative Absorbance Margin 100
 Slit Width 4 nm
 Spectrum Range From(nm) 190
 Spectrum Range To(nm) 950

Spectrum Range Step(nm)	2.00
Threshold(mAU)	0.10

Signals

	WL	BW	RWL	RBW
A	220	4	360	100
B	254	4	OFF	OFF
C	280	4	OFF	OFF
D	227	4	OFF	OFF
E	280	4	OFF	OFF

8.1.2 Geräteeinstellung für die Bestimmung von N-tert-Butoxycarbonyl-Derivaten

Mariner System State

Instrument State	ON
Ion Polarity	POS
Auxillary Gas	ON
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0169939E-007
Calibration Constant B	65.376134
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	5492.58
SCIEX Heater	270.02

API Interface Settings

Nozzle Potential	80.08
Skimmer 1 Potential	11.01
Quadrupole DC Potential	6.01
Deflection Voltage	-0.29
Einzel Lens Potential	-20.00
Quadrupole RF Voltage	999.76
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	140.01

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	519.92
Pull Pulse Potential	229.38
Pull Bias Potential	0.00
Acceleration Potential	3999.94
Reflector Potential	1549.99
Detector Voltage	1973.91

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	100.00
Last Mass	500.00
Accumulate Spectra	OFF

Standby at End of Acquisition OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra OFF

System Settings

Gas Control Mode Manual
 Syringe Pump Mode Manual
 Syringe Pump Rate 0.00
 Syringe Diameter 0.46
 Min Analyzer Mass 40.00
 Max Analyzer Mass 4000.00

LC Settings

Pump Run Time(min) 20.00
 Pump Post Time(min) 10.00
 Pump Type BINARY WITH SSV
 Pump Flow Rate(mL/min) 0.80
 Pump Flow Ramp(mL/min * min) 1.00
 High Pressure(bar) 400.00
 Low Pressure(bar) 0.00
 Solvent Channel A 1
 Solvent Channel B 1
 Solvent Comp. A(%) 60
 Solvent Comp. B(%) 40

Time	Comp-A	Comp-B	Flow Rate	EC1	EC2	EC3	EC4
0.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
20.00	0.0	100.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
23.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
30.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore

Wash Vial # 11
 Default Injection Volume(μL) 50.00
 Eject Speed(μL) 200
 Draw Position(mm) 0.00
 Draw Speed(μL) 200
 Thermo Temp. OFF
 Left Column Temp. 30.00
 Right Column Temp. SAME AS LEFT
 Column Ready at ANY TEMPERATURE
 DA Detector Balance (Prerun) ON
 DA Detector Balance (Postrun) OFF
 UV Lamp Required ON
 VIS Lamp Required OFF
 Peak Width > 0.05 min (1 s)
 Negative Absorbance Margin 100
 Slit Width 4 nm
 Spectrum Range From(nm) 190
 Spectrum Range To(nm) 950
 Spectrum Range Step(nm) 2.00

Threshold(mAU)	0.10
----------------	------

Signals

	WL	BW	RWL	RBW
A	215	4	360	100
B	312	4	360	100
C	280	4	OFF	OFF
D	227	4	OFF	OFF
E	280	4	OFF	OFF

8.1.3 Geräteeinstellung für die Bestimmung von Chinoxalinen

Mariner System State

Instrument State	ON
Ion Polarity	POS
Auxillary Gas	ON
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0169939E-007
Calibration Constant B	85.554882
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	5492.58
SCIEX Heater	469.97

API Interface Settings

Nozzle Potential	80.08
Skimmer 1 Potential	11.01
Quadrupole DC Potential	6.01
Deflection Voltage	-0.29
Einzel Lens Potential	-20.00
Quadrupole RF Voltage	999.76
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	120.00

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	519.92
Pull Pulse Potential	229.38
Pull Bias Potential	0.00
Acceleration Potential	3999.94
Reflector Potential	1549.99
Detector Voltage	1973.91

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	100.00
Last Mass	500.00
Accumulate Spectra	OFF

Standby at End of Acquisition OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra OFF

System Settings

Gas Control Mode Manual
 Syringe Pump Mode Manual
 Syringe Pump Rate 0.00
 Syringe Diameter 0.46
 Min Analyzer Mass 40.00
 Max Analyzer Mass 4000.00

LC Settings

Pump Run Time(min) 20.00
 Pump Post Time(min) 10.00
 Pump Type BINARY WITH SSV
 Pump Flow Rate(mL/min) 0.80
 Pump Flow Ramp(mL/min * min) 1.00
 High Pressure(bar) 400.00
 Low Pressure(bar) 0.00
 Solvent Channel A 2
 Solvent Channel B 1
 Solvent Comp. A(%) 60
 Solvent Comp. B(%) 40

Time	Comp-A	Comp-B	Flow Rate	EC1	EC2	EC3	EC4
0.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
20.00	0.0	100.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
23.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore
30.00	60.0	40.0	0.80	Ignore	Ignore	Ignore	Ignore

Wash Vial # 11
 Default Injection Volume(μL) 50.00
 Eject Speed(μL) 200
 Draw Position(mm) 0.00
 Draw Speed(μL) 200
 Thermo Temp. OFF
 Left Column Temp. 30.00
 Right Column Temp. SAME AS LEFT
 Column Ready at ANY TEMPERATURE
 DA Detector Balance (Prerun) ON
 DA Detector Balance (Postrun) OFF
 UV Lamp Required ON
 VIS Lamp Required OFF
 Peak Width > 0.05 min (1 s)
 Negative Absorbance Margin 100
 Slit Width 4 nm
 Spectrum Range From(nm) 190
 Spectrum Range To(nm) 950
 Spectrum Range Step(nm) 2.00

Threshold(mAU)	0.10
----------------	------

Signals

	WL	BW	RWL	RBW
A	215	4	360	100
B	312	4	360	100
C	280	4	OFF	OFF
D	227	4	OFF	OFF
E	280	4	OFF	OFF

8.1.4 Elektronenstoßionisation-Time of Flight Messung (ESI-TOF)

8.1.4.1 t-Butoxycarbonylamino-[5-(3-hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (Boc-PIO)

Mariner System State

Instrument State	ON
Ion Polarity	POS
Auxillary Gas	OFF
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0306543E-007
Calibration Constant B	66.218728
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	4207.62
SCIEX Heater	0.00

API Interface Settings

Nozzle Potential	90.09
Skimmer 1 Potential	9.50
Quadrupole DC Potential	6.49
Deflection Voltage	-0.95
Einzel Lens Potential	-29.00
Quadrupole RF Voltage	999.76
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	130.00

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	580.28
Pull Pulse Potential	209.96
Pull Bias Potential	10.00
Acceleration Potential	3999.94
Reflector Potential	1549.99
Detector Voltage	1949.98

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	100.00

Last Mass	750.00
Accumulate Spectra	OFF
Standby at End of Acquisition	OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra	OFF
------------------	-----

System Settings

Gas Control Mode	Manual
Syringe Pump Mode	Manual
Syringe Pump Rate	10.00
Syringe Diameter	1.46
Min Analyzer Mass	40.00
Max Analyzer Mass	4000.00

8.1.4.2 N- δ -[5-(3-Hydroxypropyl)-4-oxo-imidazol-2-yl]-L-ornithin (PIO)*Mariner System State*

Instrument State	ON
Ion Polarity	POS
Auxillary Gas	OFF
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0301176E-007
Calibration Constant B	65.547818
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	4988.67
SCIEX Heater	0.00

API Interface Settings

Nozzle Potential	179.93
Skimmer 1 Potential	9.50
Quadrupole DC Potential	6.49
Deflection Voltage	-0.95
Einzel Lens Potential	-29.00
Quadrupole RF Voltage	999.76
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	130.00

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	580.28
Pull Pulse Potential	209.96
Pull Bias Potential	10.00
Acceleration Potential	3999.94
Reflector Potential	1549.99
Detector Voltage	1999.79

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	100.00

Last Mass	1000.00
Accumulate Spectra	OFF
Standby at End of Acquisition	OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra	OFF
------------------	-----

System Settings

Gas Control Mode	Manual
Syringe Pump Mode	Manual
Syringe Pump Rate	7.00
Syringe Diameter	1.46
Min Analyzer Mass	40.00
Max Analyzer Mass	4000.00

8.4.1.3 3,4-Dideoxypentosulose

Mariner System State

Instrument State	ON
Ion Polarity	OS
Auxillary Gas	FF
Curtain Gas	ON
Nebulizer Gas	ON
Calibration Constant A	5.0295905E-007
Calibration Constant B	58.892857
TDC Deadtime	10

Source Settings

Spray Tip Potential	007.81
SCIEX Heater	0.00

API Interface Settings

Nozzle Potential	60.06
Skimmer 1 Potential	.50
Quadrupole DC Potential	6.49
Deflection Voltage	0.95
Einzel Lens Potential	29.00
Quadrupole RF Voltage	399.90
Quadrupole Temperature	140.01
Nozzle Temperature	20.00

Analyzer Settings

Push Pulse Potential	80.28
Pull Pulse Potential	09.96
Pull Bias Potential	0.00
Acceleration Potential	999.94
Reflector Potential	549.99
Detector Voltage	2050.26

Spectrum Acquisition Settings

Seconds Per Spectrum	3.00
Ion Count Threshold	0.00
First Mass	80.00

Last Mass	500.00
Accumulate Spectra	OFF
Standby at End of Acquisition	OFF

Centroid Spectra Settings

Centroid Spectra	OFF
------------------	-----

System Settings

Gas Control Mode	Manual
Syringe Pump Mode	Manual
Syringe Pump Rate	10.00
Syringe Diameter	1.46
Min Analyzer Mass	40.00
Max Analyzer Mass	4000.00

8.2 Bestimmung von 3-Desoxyentulose in Milch

8.2.1 Ermittlung der Kalibriergerade für 3-Desoxyentulose

Zur Ermittlung der Kalibriergerade für die Bestimmung von 3-DP in Milch wie in 3.3.6.2 beschrieben vorgehen. In Tabelle 8.2.1-1 sind Verdünnungen und die dazugehörigen Flächen, als Summe von beiden isomeren Formen der 3-DP dargestellt.

Tabelle 8.2.1-1: Verdünnungsreihe von 3-DP-Standardsubstanz mit dazugehörigen Peakflächen

c [mg /l]	3DP/IS
25	0,0777
50	0,1750
100	0,3800
125	0,4154
250	1,1840
500	2,5676
1000	5,8372

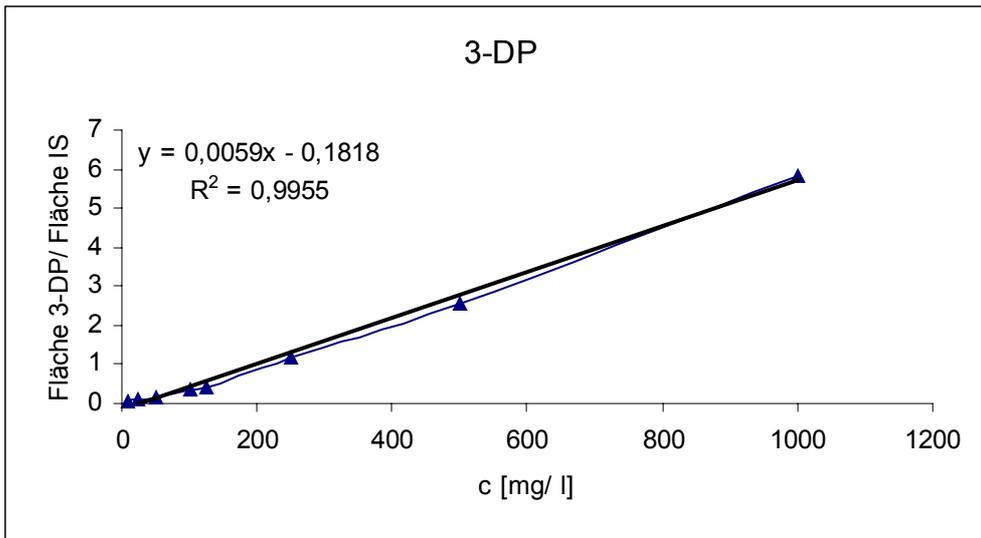


Abbildung 8.2.1-1: Kalibriergerade für 3-Desoxyentulose

8.2.2 Bestimmung von 3-Desoxyentulose in Milch

Tabelle 8.2.2-1: Ermittlung des 3-DP-Gehaltes in Milchproben

Probe	$3DP_{\text{Fläche}}/IS_{\text{Fläche}}$	c 3DP [mg/l]
UHT-Milch 1, 0 h	0,0759	43,69
UHT-Milch 1, 1h, 120 °C	1,1238	221,28
UHT-Milch 1, 2 h, 120°C	1,1397	223,99
UHT-Milch 2, 0 h	0,1124	49,87
UHT-Milch 2, 1 h, 120 °C	0,9411	190,32
UHT-Milch 2, 2 h, 120 °C	1,1818	231,13
UHT-Milch 3, 0 h	0,0096	32,45
UHT-Milch 3, 1 h, 120 °C	0,9604	193,60
UHT-Milch 3, 2 h, 120 °C	1,2207	237,72
Kondensmilch	0,6490	140,82

8.3 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmitteln

8.3.1 Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen in Milchprodukten

Kalibriergerade für Glyoxal

Zur Erstellung der Kalibriergerade für Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucoson und 3-Desoxypentosulose eine Stammlösung wie in 3.7.1 beschrieben herstellen. Verdünnungen entsprechend Tabelle 3.7.1-2 vornehmen. Jede Verdünnung dreimal vermessen und den Mittelwert aus einzelnen Peakflächen daraus bilden.

Tabelle 8.3.1-1 Verdünnungen von Glyoxal in der Stammlösung und die dazugehörigen Peakflächen zur Erstellung der Kalibriergerade

GO [mg/l]	Fläche1 [mAU*min]	Fläche2 [mAU*min]	Fläche3 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
0,29	0,5514	0,4965		0,5240
0,59	1,0353	0,8959	0,8706	0,9339
2,94	4,7948	4,7246	4,6342	4,7179
8,82	12,6048	16,6701	14,6832	14,6527
14,7	20,0759	28,6769	24,6345	24,4624

Tabelle 8.3.1-2: Verdünnungen von Methylglyoxal in der Stammlösung und die dazugehörigen Peakflächen zur Erstellung der Kalibriergerade

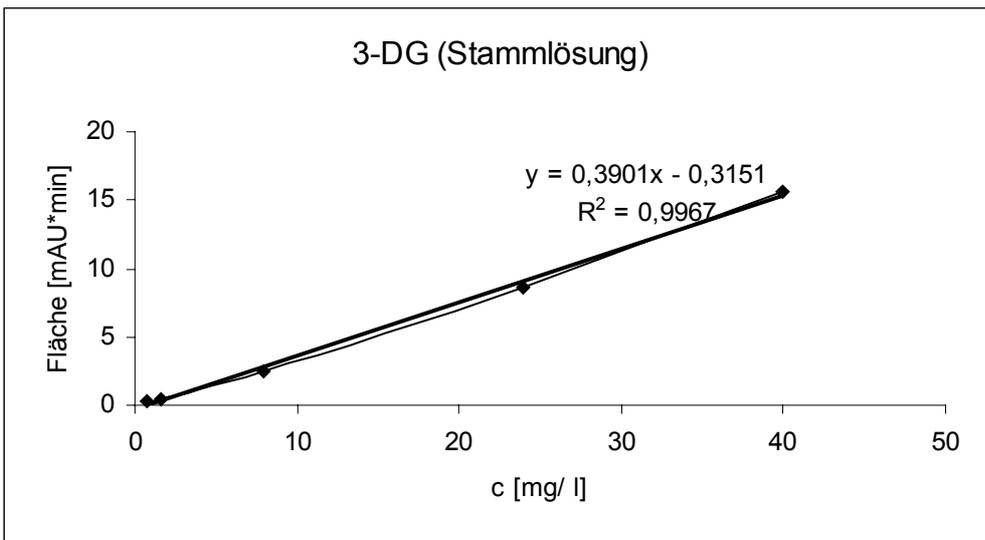
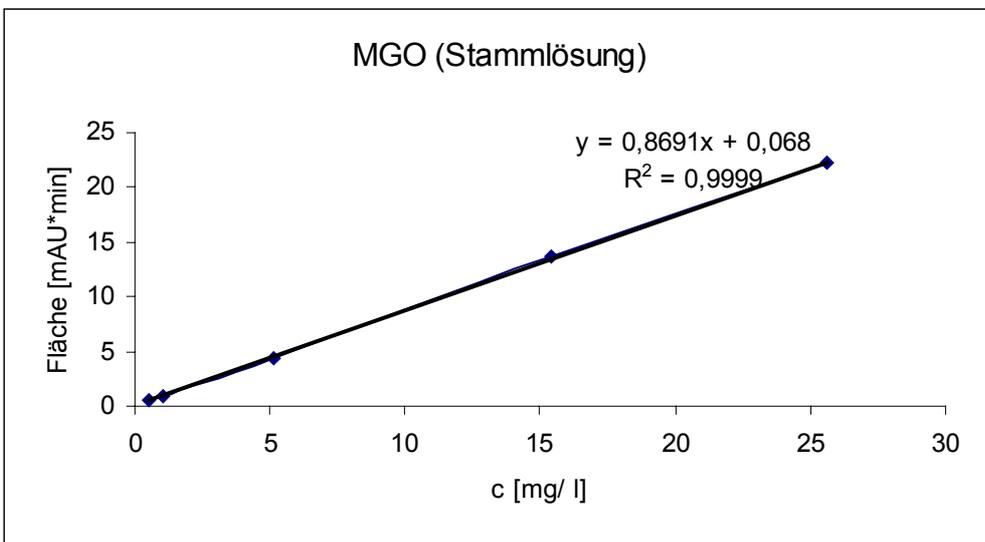
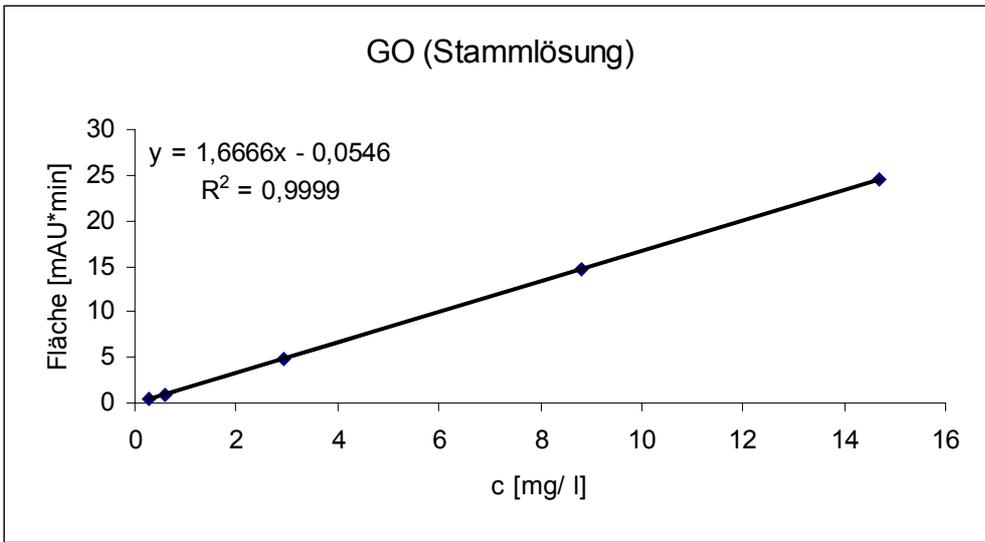
MGO [mg/l]	Fläche1 [mAU*min]	Fläche2 [mAU*min]	Fläche3 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
0,51	0,5451	0,5923	-	0,5687
1,05	1,0116	0,8756	0,8995	0,9289
5,128	4,4343	4,4428	4,43	4,4357
15,384	11,6891	15,3166	13,7874	13,5977
25,64	17,702	26,3601	22,7568	22,2730

Tabelle 8.3.1-3: Verdünnungen von 3-Desoxyglucosulose in der Stammlösung und die dazugehörigen Peakflächen zur Erstellung der Kalibriergerade

3-DG [mg/l]	Fläche1 [mAU*min]	Fläche2 [mAU*min]	Fläche3 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
0,8	0,2545	0,3383	-	0,2964
1,6	0,4808	0,4870	0,5070	0,4916
8,0	2,4665	2,5705	2,3111	2,4494
24,0	7,0748	10,1175	8,5755	8,5893
40,0	-	16,8696	14,3769	15,6233

Tabelle 8.3.1-4: Verdünnungen von 3-Desoxypentosulose in der Stammlösung und die dazugehörigen Peakflächen zur Erstellung der Kalibriergerade

3-DPs [mg/l]	Fläche1 [mAU*min]	Fläche2 [mAU*min]	Fläche3 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
0,67	0,2673	0,3685	-	0,3179
1,33	0,5909	0,5543	0,5357	0,5603
6,65	2,7047	2,8127	2,5929	2,7034
19,95	7,7355	10,591	9,2178	9,1814
33,25	-	18,1289	15,4946	16,8118



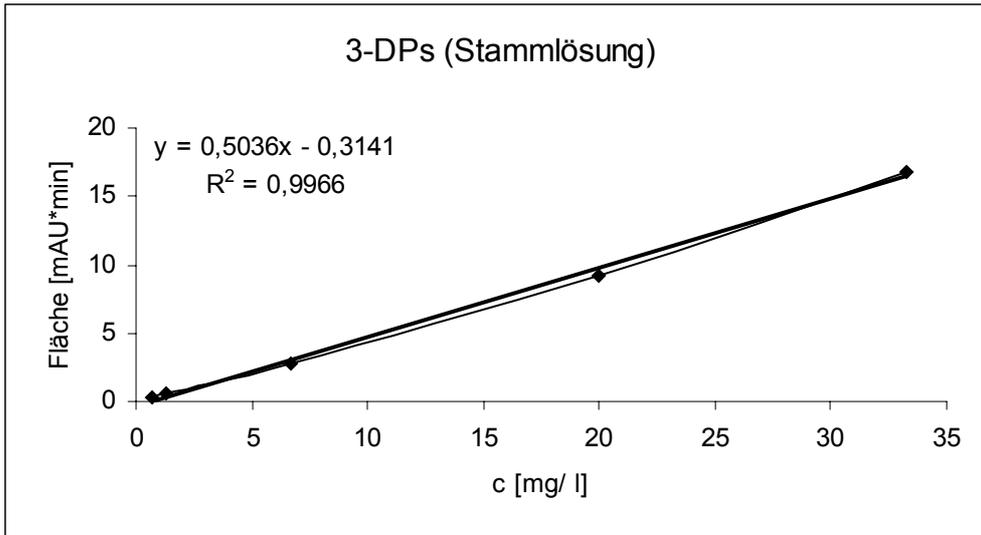


Abbildung 8.3.1-1: Kalibriergerade für Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose in der Stammlösung

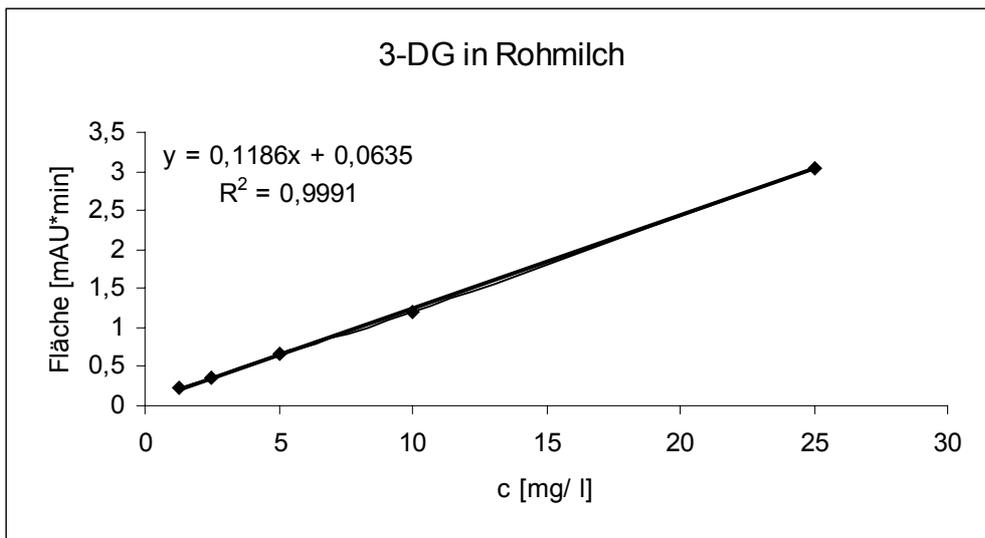
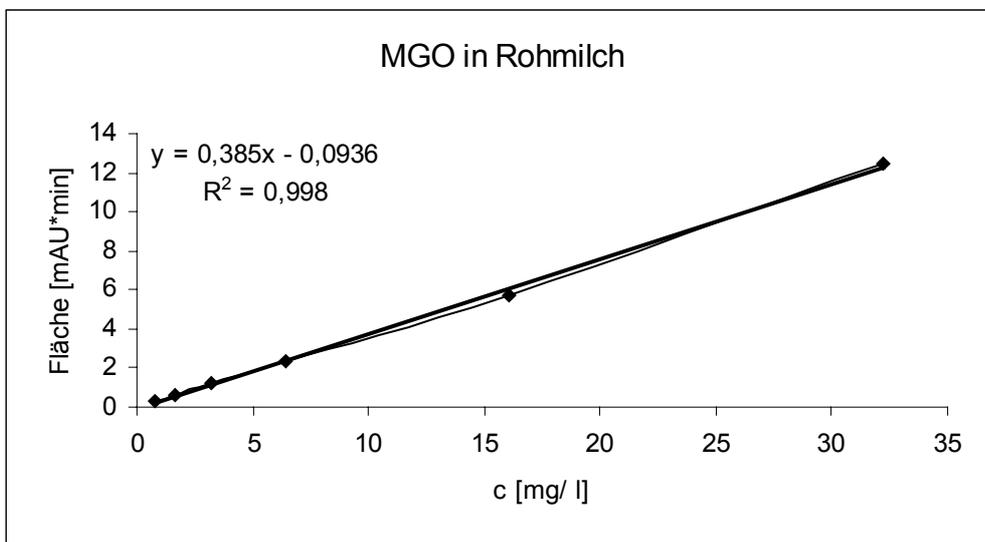
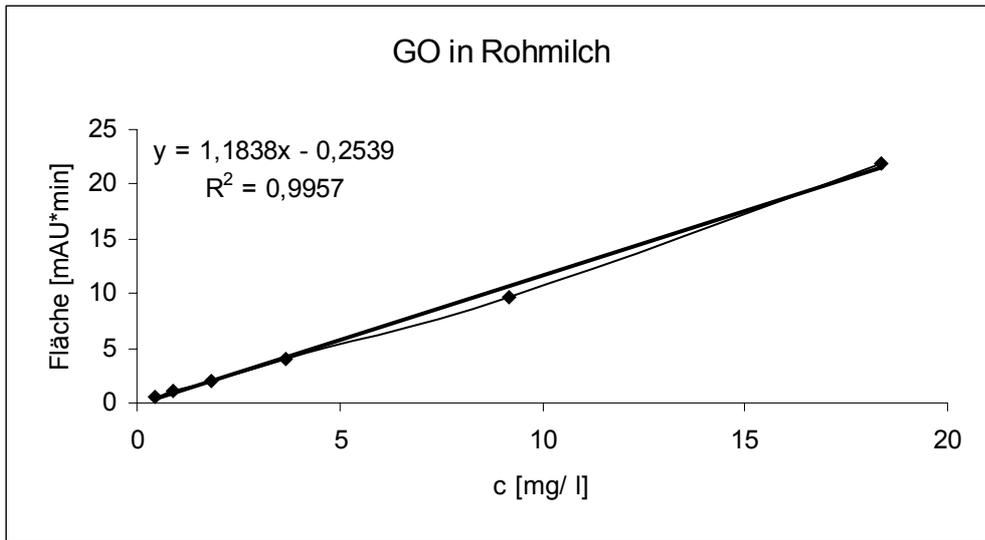
Matrixkalibrierung an einer Rohmilch

Tabelle 8.3.1-5: Verdünnungen von Glyoxal und Methylglyoxal in der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergerade für die Matrixkalibrierung

GO [mg/l Milch]	Fläche [mAU*min]	MGO [mg/l]	Fläche [mAU*min]
0	0,4059	0	0
0,232	1,4591	0,18	0,782
0,464	2,6606	0,36	1,5312
0,928	5,1395	0,72	3,0166
1,856	9,8192	1,44	5,8577
4,64	23,9949	3,6	14,2635

Tabelle 8.3.1-6: Verdünnungen von 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose in der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergerade für die Matrixkalibrierung

3-DG [mg/l]	Fläche [mAU*min]	3-DPs [mg/l]	Fläche [mAU*min]
0	0,2219	0	0,225
0,40	0,6012	0,4125	0,5339
0,81	0,8896	0,825	0,8121
1,62	1,6783	1,65	1,6851
3,24	2,9741	3,3	3,2625
8,1	7,6189	8,25	8,3597



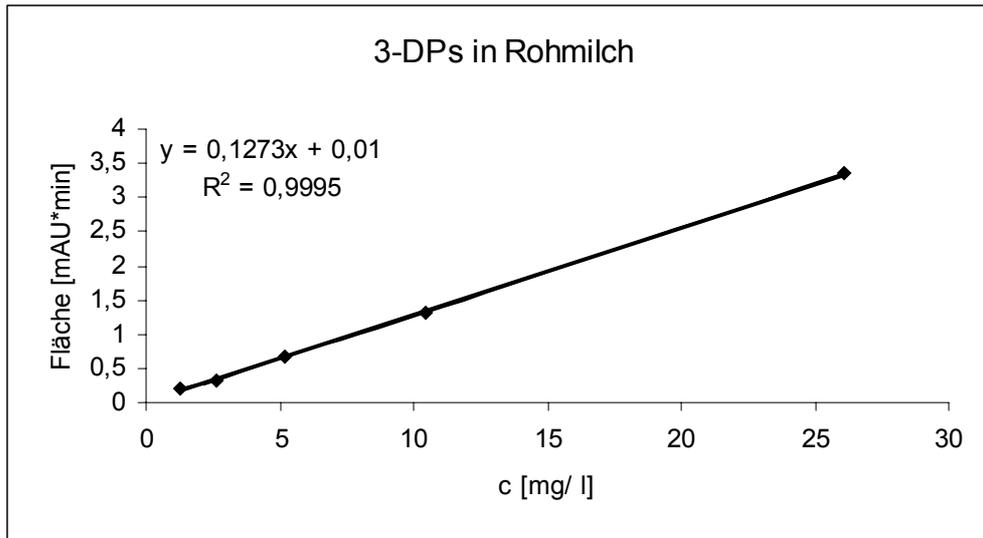


Abbildung 8.3.1-2: Kalibriergerade für Glyoxal, Methylglyoxal, 3-Desoxyglucosulose und 3-Desoxypentosulose in Rohmilch

Ermittlung der Wiederfindung

Tabelle 8.3.1.1-6: Ermittlung der Wiederfindung von Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose in der Milchmatrix

	IstGehalt [mg/l]	SollGehalt [mg/l]	Wiederfindung [%]
GO: Rohmilch + SL	0,693	0,696	99,6
SL	1,854	1,856	99,9
MGO: Rohmilch + SL	n.b.	n.b.	n.b.
SL			
3-DG: Rohmilch + SL	1,267	1,752	72,3
SL	1,31	1,75	74,8
3-DPs: Rohmilch + SL	1,127	1,98	56,9
SL	1,93	3,30	58,4

n.b.: nicht bestimmt

8.3.2 Bestimmung von Carbonylverbindungen in Honigen

8.3.2.1 Ermittlung der Kalibriergeraden von 1,2-Dicarbonylverbindungen

Zur Bestimmung einzelner 1,2-Dicarbonylverbindungen in Honig GO, MGO und 3-DG wie in 3.7.2.2 herstellen und Kalibriergeraden erstellen.

Tabelle 8.3.2.1-1: Verdünnungen von Glyoxal in der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergerade

GO [mg/kg]	Fläche 1 [mAU*min]	Fläche 2 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
15	41,0225	40,0009	40,5117
12	35,1412	34,7924	34,9668

8 Anhang

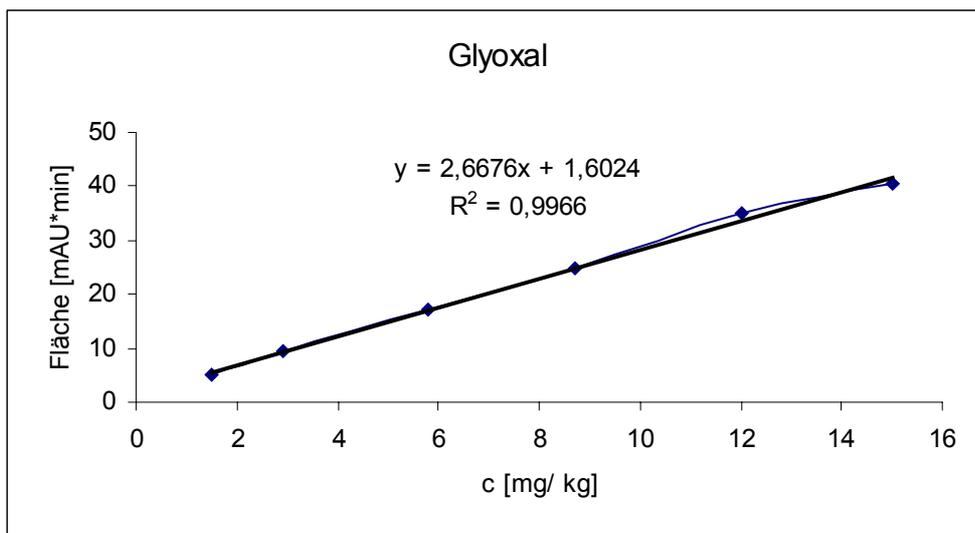
8,7	25,1536	24,3872	24,7704
5,8	17,648	16,908	17,278
2,9	9,8794	8,9425	9,411
1,5	5,0829	5,1519	5,1174

Tabelle 8.3.2.1-2: Verdünnungen von Methylglyoxal in der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergerade

MGO [mg/ kg]	Fläche 1 [mAU*min]	Fläche 2 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
90	137,0365	234,6187	235,8276
45	116,9558	115,6693	116,3126
23	61,9116	60,387	61,1493
11	31,9456	30,7606	31,3531
4,5	13,8408	12,3926	13,1167
0,5	1,5127	1,3907	1,4517

Tabelle 8.3.2.1-3: Verdünnungen von 3-Desoxyglucosulose in der Stammlösung zur Erstellung der Kalibriergerade

3-DG [mg/ kg]	Fläche 1 [mAU*min]	Fläche 2 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
194	121,3769	119,598	120,4875
155	91,3104	91,328	91,3192
116	71,1591	70,0433	70,6012
78	48,3809	47,2991	47,84
39	24,6676	23,8162	24,2419
19	11,94	11,5163	11,7282



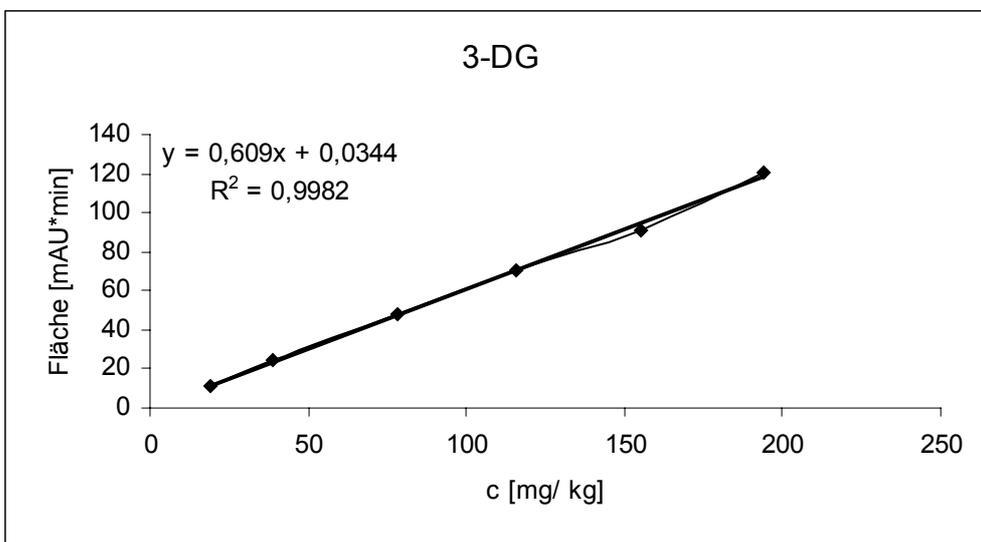
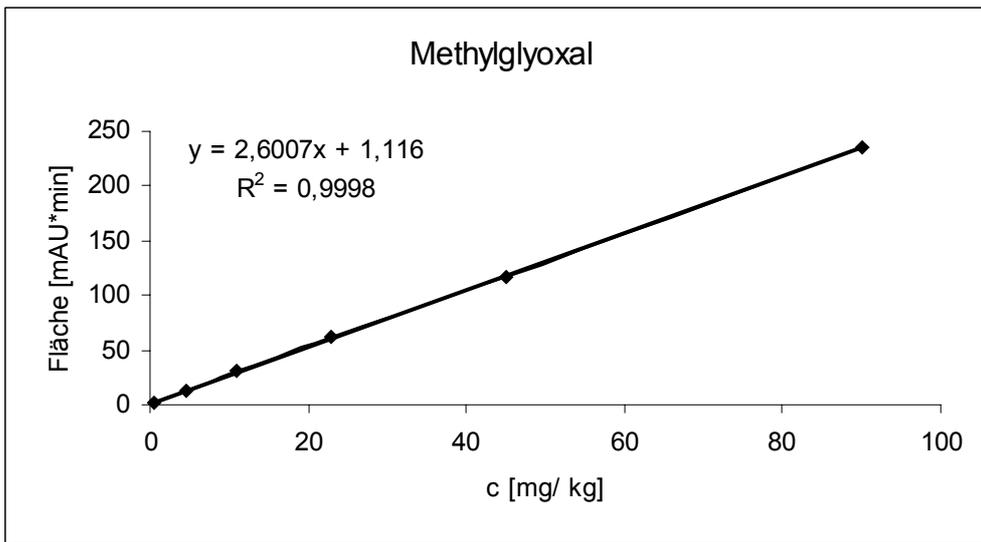


Abbildung 8.3.2.1-1: Kalibriergerade für Glyoxal, Methylglyoxal und 3-Desoxyglucosulose in der Stammlösung

8.3.2.2 Bestandsaufnahme von Honigen

Tabelle 8.3.2.2-1: Bestimmung von GO, MGO und 3-DG in 30 %-igen Honig Lösungen in 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 (Nr. 1 bis 22)

Honig- nummer	Einwaage [g]/ 10 ml	c (3-DG) [mg/ kg]	c (GO) [mg/ kg]	c (MGO) [mg/ kg]
1	3,0182	119	< BG	2,6
2	3,0447	337	0,2	3,1
3	3,0282	222	1,5	4,5
4	3,0045	572	3,3	6,7
5	3,0080	361	0,8	3,9
6	3,0264	366	3,3	4,4
7	3,0172	1451	3,6	5,7
8	3,0417	224	1,9	5,3
9	3,0290	530	0,9	4,0
10	3,0359	252	2,4	6,6
11	3,0135	456	0,8	4,6
12	3,0178	195	0,7	9,4
13	3,0322	322	2,1	3,2
14	2,9987	307	1,7	3,5
15	3,0374	562	1,2	3,7
17	3,0339	335	3,9	4,7
18	3,0304	274	2,3	5,7
19	3,0182	258	1,8	5,5
20	3,0331	257	1,9	5,5
21	3,0214	168	1,6	3,1
22	3,0280	160	2,8	4,3

8 Anhang

Tabelle 8.3.2.2-2: Bestimmung von GO, MGO und 3-DG in 15 %-igen Honigen in 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,5 (Nr. 23 bis 53)

Honig- nummer	Abbildung	Einwaage [g]/ 10 ml	c (3-DG) [mg/ kg]	c (GO) [mg/ kg]	c (MGO) [mg/ kg]
23		3,0767	372	0,8	2,5
24		3,0693	1045	1,2	2,5
25		3,0916	708	2,0	0,5
26		2,9876	1219	2,3	2,2
27		2,9740	490	1,3	1,1
28		3,0116	415	1,6	1,1
29		3,2056	512	1,2	3,4
30		3,0618	754	1,0	4,6
31		3,0331	347	1,0	2,4
32		2,9656	1060	0,7	8,4
33		3,0284	135	0,9	1,2
34		3,0764	301	1,3	3,1
35		3,0535	295	< BG	< BG
36		2,9517	574	1,8	2,6

8 Anhang

37		3,0363	329	2,3	3,5
38		2,9560	451	4,6	3,6
39		3,0053	179	1,5	2,1
40		2,9382	933	2,1	3,08
41		3,2634	668	3,0	347,0
42		3,2704	563	3,9	411,0
43		3,2350	747	1,2	415,6
44		3,3850	807	4,2	743,2
45		3,1095	279	2,8	16,2
46		3,1811	1104	4,3	17,4
47		3,0950	419	1,6	68,8
48		3,2665	681	3,0	32,5
49		3,3644	334	2,7	3,2
50		3,3960	358	1,2	< BG

51		3,2548	394	2,2	46,3
52		3,2060	509	1,6	40,1
53		3,2020	836	2,6	20,1

< BG: unter Bestimmungsgrenze

8.3.3 Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig

8.3.3.1 Ermittlung der Kalibriergerade für 5-Hydroxymethylfurfural

Tabelle 8.3.3.1-1: Verdünnungen von HMF zur Erstellung der Kalibriergerade

c (HMF) [mg/l]	Fläche 1 [mAU*min]	Fläche 2 [mAU*min]	Mittelwert [mAU*min]
0,24	0,3793	0,4171	0,3982
0,48	1,0099	0,8512	0,9306
0,96	2,1887	2,1221	2,1554
1,92	3,9999	4,1901	4,095
2,40	5,1974	5,2093	5,2034

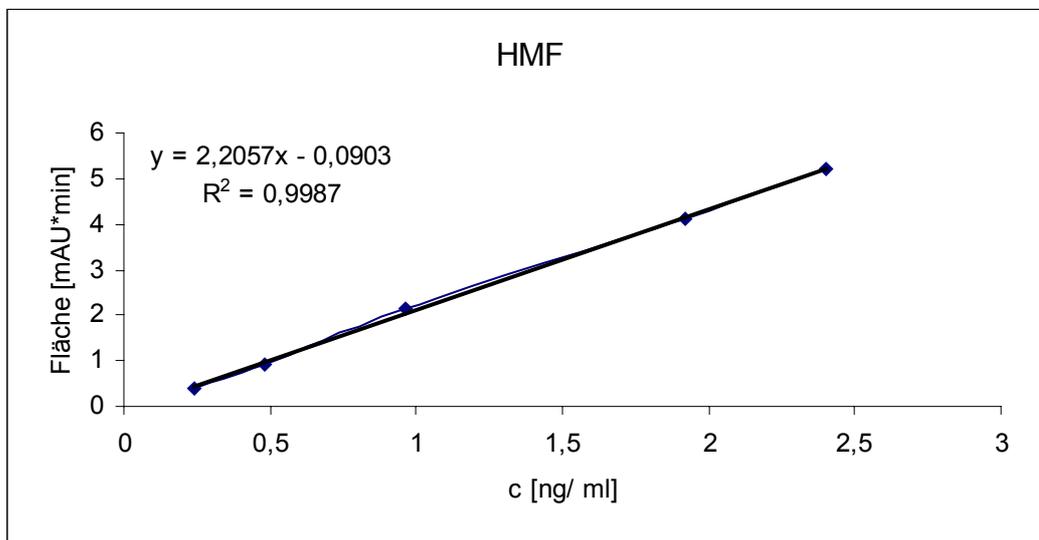


Abbildung 8.3.3.1-1: Kalibriergerade von HMF

8.3.3.2 Ermittlung des Gehaltes von 5-Hydroxymethylfurfural in Honig

Tabelle 8.3.3.2-1: Bestimmung von 5-Hydroxymethylfurfural in 10 %-igen wässrigen Lösungen von Honige 1 bis 53

Honig- nummer	Einwaage 1 g/10 ml	Einwaage 2 g/ 10 ml	c ₁ (HMF) [mg/ kg]	c ₂ (HMF) [mg/ kg]	Mittelwert [mg/ kg]
1	1,0061	0,9532	4,7	0,9	2,8
2	1,0149	0,9913	2,9	2,1	2,5
3	1,0094	0,9683	4,4	5,7	5,1
4	1,0015	1,0013	8,5	4,7	6,6
5	1,0027	1,0136	5,3	2,1	3,7
6	1,0088	0,9876	3,6	1,9	2,7
7	1,0057	1,0129	7,5	5,1	6,3
8	1,0139	0,9724	6,2	1,5	3,9
9	1,0967	1,0043	2,0	0,4	1,2
10	1,0120	0,9966	6,7	3,3	5,0
11	1,0045	0,9657	5,9	1,8	3,9
12	1,0059	0,9616	5,2	2,0	3,6
13	1,0107	1,0045	3,4	1,7	2,6
14	0,9996	1,0072	3,4	2,2	2,8
15	1,1247	1,0383	3,2	0,6	1,9
17	1,0111	0,9928	2,4	2,8	2,6
18	1,0101	1,0321	4,4	4,4	4,4
19	1,0061	0,9912	3,3	0,2	1,8
20	1,0010	1,0193	6,3	1,6	3,9
21	1,0713	0,9731	2,2	0,4	1,3
22	1,0933	1,0141	9,4	9,2	9,3
23	1,0022	1,0334	5,2	6,3	6,6
24	1,0031	1,0236	6,1	4,2	5,7
25	1,0174	0,9778	13,7	6,4	10,9
26	1,0096	1,0390	5,3	6,4	5,8
27	1,0114	1,0045	14,5	17,6	15,7
28	1,0056	1,0161	6,2	9,3	8,3
29	1,0152	1,0108	18,1	26,2	23,0
30	1,0063	1,0059	9,1	15,6	11,4
31	1,0057	0,9936	8,2	11,9	9,8
32	1,0283	1,0239	4,6	2,6	3,0
33	1,0267	1,0196	1,0	1,2	1,0
34	1,0221	1,0202	2,8	4,0	3,2
35	1,0912	1,0206	1,7	3,0	2,3
36	1,1883	1,0222	5,6	11,1	8,6
37	1,1410	0,9997	6,9	7,5	7,0
38	1,0145	1,0093	3,3	4,2	3,5
39	1,0076	1,0067	1,5	2,0	2,3
40	0,9984	1,0026	78,2	73,4	75,1
41	1,0878	1,0004	25,0	20,1	22,6
42	1,0901	1,0079	16,4	18,9	17,6
43	1,0783	1,0063	20,9	21,8	21,3
44	1,1283	1,0008	40,9	46,8	43,9
45	1,0365	1,0013	4,5	2,5	3,5
46	1,0604	1,0135	48,4	52,4	50,4

8 Anhang

47	1,0317	1,0076	4,9	5,8	5,4
48	1,0888	1,0119	6,0	7,7	6,8
49	1,1215	1,0145	12,5	12,5	12,5
50	1,1320	1,0105	19,1	17,0	18,0
51	1,0849	1,0079	11,1	10,4	10,7
52	1,0687	1,0262	4,0	5,1	4,6
53	1,0673	1,0241	1,0	1,7	1,4

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 am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr.-Ing. habil. Thomas Henle 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 allen Teilen an.

Elvira Mavrić

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Henle, Direktor am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden, für die Betreuung, stetige Unterstützung und interessante, aufbauende Diskussionen sowie seinen Optimismus und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Gerold Barth, Direktor am Institut für Mikrobiologie, möchte ich danken für die Möglichkeit, einen Teil der Arbeit im Institut für Mikrobiologie durchführen zu können sowie für seine Hilfe bei der Auswertung der mikrobiologischen Tests.

Bei dem Imkerverband Dresden möchte ich mich für die großzügige Bereitstellung von Honigproben bedanken.

Bei Frau DLC Susanne Rättich, Frau DLC Silvia Wittmann und Frau DLC Carmen Schuster möchte ich mich für ihre engagierte Mitarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten bedanken. Bei meiner Diplomandin Frau Nadine Rudolph bedanke ich mich für ihr außerordentliches Interesse und Engagement für die Diplomarbeit. Frau Dipl.-Ing.(FH) Karla Schlosser danke ich für die Durchführung der Aminosäureanalyse und Herrn Dr. Uwe Schwarzenbolz für die Messungen mittels LC-ESI-MS. Frau Dr. Heike Raddatz danke ich für die Unterstützung bei den Messungen am GC-MS. Bei Frau Annett Rudolph, Frau Dr. Margit Gruner und Frau Anke Peritz vom Institut für Organische Chemie bedanke ich mich für die Aufnahme von NMR-Spektren sowie für die Durchführung von Elementaranalyse.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Lebensmittelchemie TU Dresden danke ich für gutes Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. René Krause für die Hilfe bei der Auswertung von NMR-Spektren sowie für sein Interesse an dieser Arbeit.