

Beiträge zur Chemie der nichtenzymatischen Bräunung von oligomeren Kohlenhydraten

Vorgelegt von
Diplomlebensmittelchemikerin
Anke Hollnagel
aus Schwerin

Vom Fachbereich 15 –Lebensmittelchemie-
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.
vorgelegte Dissertation

Berichter: Prof. Dr. Lothar W. Kroh
Berichter: Dr. Martinus A. I. S. van Boekel
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Hans-Jürgen Stan

Tag der mündlichen Prüfung
Berlin 19 April 2000

D 83/FB 15 Nr. 171

Abstract

Anke Hollnagel

Beiträge zur Chemie der nichtenzymatischen Bräunung von oligomeren Kohlenhydraten

Zur Untersuchung der nichtenzymatischen Bräunung von Oligosacchariden werden Modellsysteme mit D-Glucose, D-Fructose, Maltose, Maltulose, Maltotriose bzw. Dextrin 10 allein und in Gegenwart von Glycin in wässriger Lösung und ohne Zusatz von Wasser (quasi wasserfrei) in geschlossenen Ampullen bei 100 °C gebräunt. Die dabei gebildeten α -Dicarbonyle sind nach einer Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) mittels HPLC/DAD leicht zu analysieren. Außerdem werden der Abbau der Kohlenhydrate als Ausgangsstoff, die Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad (als der Ausgangsstoff) und weitere Parameter, wie die Bildung von Isomerisierungs- und Amadoriprodukten, untersucht.

Unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen entstehen mehr α -Dicarbonyle im glycinhaltigen Reaktionsgemisch als in den Caramelisierungsmodellen. Dabei dominiert in den Maillard-Reaktionsmodellen der Oligosaccharide die 1,4-Didesoxyhexosulose, für die ein Bildungsmechanismus über eine „Peeling Off“-Reaktion am reduzierenden Ende vorgeschlagen wird. In Anwesenheit von Glycin verläuft der Abbau der Kohlenhydrate erwartungsgemäß schneller. Außerdem wird die Bildung von Sacchariden mit niedrigerem Polymerisierungsgrad als der Ausgangsstoff verstärkt.

In wässriger Lösung wird durch die Anwesenheit von Glycin ebenfalls eine höhere Konzentration an α -Dicarbonylen gebildet als bei der Caramelisierung. Hauptkomponente bei den Oligosacchariden ist die 3-Desoxypentosulose. Für deren Bildung wird eine Retro-Claisen Esterkondensation am reduzierenden Ende der Saccharidkette vorgeschlagen, die auch die Bildung von Ameisensäure und anderer Maillard-Reaktionsprodukte erklärt. In Anwesenheit von Glycin werden sowohl die Kohlenhydrate schneller abgebaut als auch die Bildung von Sacchariden mit niedrigerem Polymerisierungsgrad verstärkt. Darüber hinaus spielt in wässriger Lösung die hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung eine wichtige Rolle.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1998) Formation of α -Dicarbonyl Fragments from Mono- and Disaccharides under Caramelization and Maillard Reaction Conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, , **207**, 50-54.

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1999) Degradation of Oligosaccharides in non-enzymatic Browning by Formation of α -Dicarbonyl Compounds via a "Peeling Off" Mechanism, *J. Agric. Food Chem.*, eingereicht.

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1999) Role of a Pentose Derivative with α -Dicarbonyl Structure in Degradation of Oligosaccharides during non-enzymatic Browning in aqueous Solution, *J. Agric. Food Chem.*, eingereicht.

Mündliche Präsentationen:

1997-1999 milestone reports innerhalb eines FAIR-Projektes der EU in Reading (UK), Reykjavik (IS), Neapel (I) und Lund (S)

Posterpräsentationen:

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1997) Role of Oligo- and Polymeric Carbohydrates in the Maillard Reaction. *6th International Maillard Symposium*, London.

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1998) Quantifizierung reaktiver Intermediate mit α -Dicarbonylstruktur im Verlauf der thermisch induzierten Reaktion von Mono- und Disacchariden. *ORCHEM 98*, Bad Nauheim.

Hollnagel A. & Kroh L. W. (1999) Quantification of Reactive Intermediates with α -Dicarbonyl Structure during the Thermally induced Reaction of Mono- and Disaccharides. *2. German-East-European Carbohydrate Workshop*, Güstrow.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Betreuung von Prof. Dr. Lothar W. Kroh am Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Berlin.

Ich danke meinem Lehrer Prof. Kroh für die intensive fachliche Betreuung und die engagierte Hilfe in schwierigen Situationen während der vergangenen drei Jahre.

Für die Hilfestellung bei der Furosinbestimmung und die Übernahme des Mitberichtes danke ich Dr. Martinus A. I. S. van Boekel, Wageningen Agricultural University, Niederlande.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Christian Vogel von der Universität Rostock für die anregende Diskussion und Priv.-Doz. Dr. Clemens Mügge, Humboldt-Universität zu Berlin, für die Unterstützung bei der Aufnahme der NMR-Spektren.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Kroh und des gesamten Institutes für Lebensmittelchemie, bei denen ich viel lernen durfte.

Besonders Annette Berghäuser und Dr. Bettina Cämmerer danke ich für die Hilfestellung bei der praktischen Ausführung der Experimente bzw. für die anregende Diskussion der Ergebnisse. Den Austauschstudenten Simon Deller und Claire Atkins von der Leeds University danke ich für den im Rahmen ihrer Abschlussarbeit geleisteten Beitrag zu dieser Arbeit.

Sehr dankbar bin ich Lydia Neye für die großartige menschliche und fachliche Unterstützung während der Anfertigung der Dissertation.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit und meiner gesamten Ausbildung mit liebevollem Verständnis und steter Ermutigung begleitet haben.

*Für
Irmgard, Johannes
und Jördis*

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung.....	1
1.1 Charakterisierung und Grundlagen der nichtenzymatischen Bräunung.....	2
1.1.1 Aldosen, Ketosen und Oligosaccharide als Ausgangsstoffe für die nichtenzymatische Bräunung.....	3
1.1.2 Frühe reaktive Intermediate in der Maillard-Reaktion.....	5
1.1.3 Reaktionen und Intermediate in der Caramelisierung.....	7
1.1.4 Bildungswege von Hexosulosen und Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur.....	10
1.1.5 Struktur, Abbauewege und Relevanz der α -Dicarbonyle für die nichtenzymatische Bräunung.....	18
1.2 Analytik der α -Dicarbonyle, Evaluation der verschiedenen Abfangmethoden und Reagenzien.....	23
1.3 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Bildung der α -Dicarbonyle.....	25
2 Problemstellung und Ziele.....	28
3 Quantifizierung von Zuckerfragmenten mit α-Dicarbonylstruktur während der nichtenzymatischen Bräunung von Mono- und Oligosacchariden.....	31
3.1 Evaluation von o-Phenylendiamin (OPD) als Abfangreagenz in der Maillard-Reaktion.....	31
3.2 Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur aus D-Glucose und D-Fructose	36
3.3 α -Dicarbonyle aus Maltose und Maltulose.....	42
3.4 Neue Bildungswege für α -Dicarbonyle aus Disacchariden.....	45
4 Caramelisierung und Maillard-Reaktion im quasi Wasserfreien: Umsetzungen von D-Glucose, Maltose und Maltotriose und Fructosglycin in Anwesenheit von OPD.....	46
4.1 Caramelisierung unter quasi wasserfreien Bedingungen.....	47

4.1.1	Bildung von α -Dicarbonylverbindungen.....	47
4.1.2	Abbau der Kohlenhydratkomponente.....	49
4.1.3	Isomerisierung.....	51
4.1.4	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad.....	51
4.2	Maillard-Reaktion unter quasi wasserfreien Bedingungen.....	53
4.2.1	Bildung von α -Dicarbonylen.....	53
4.2.2	Abbau der Kohlenhydratkomponente.....	57
4.2.3	Isomerisierung.....	58
4.2.4	Bildung des Amadoriproduktes.....	57
4.2.5	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad.....	61
4.3	„Peeling Off“ als Reaktionsweg für die Bildung von 1,4- Didesoxyhexosulose.....	63
4.4	Furosin, seine Bedeutung und Analytik.....	68
4.5	Furosin in Maillard-Reaktionsmodellsystemen mit Maltose im Vergleich zu D-Glucose.....	69
4.6	Weitere mögliche Abbauprodukte der 1,4- Didesoxyhexosulose.....	71
4.7	Reaktionen von Fructosglycin im quasi Wasserfreien in Anwesenheit von OPD.....	71
4.7.1	Bildung von α -Dicarbonylen.....	72
4.7.2	Abbau des Amadoriproduktes.....	74
4.8	Vergleich der Amadoriprodukt- und α -Dicarbonylbildung im Reaktionsgemisch D-Glucose/Glycin/OPD mit der α -Dicarbonylbildung aus Fructosglycin/OPD.....	74
5	Caramelisierung und Maillard-Reaktion im Wässrigen: D-Glucose, Maltose, Maltotriose und Fructosglycin in Anwesenheit von OPD.....	76
5.1	Caramelisierung im Wässrigen.....	76
5.1.1	Bildung von α -Dicarbonylen.....	77
5.1.2	Abbau der Kohlenhydratkomponente.....	78

5.1.3	Isomerisierung.....	80
5.1.4	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad.....	80
5.2	Maillard-Reaktion im Wässrigen	82
5.2.1	Bildung von α -Dicarbonylen.....	82
5.2.2	Abbau der Kohlenhydratkomponente.....	88
5.2.3	Isomerisierung.....	89
5.2.4	Bildung der Amadoriprodukte.....	90
5.2.5	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad.....	92
5.3	Vorschläge für die Bildung von 3-Desoxypentosulose.....	92
5.4	Das Pentosederivat als Intermediat in der Bildung bekannter Maillard-Reaktionsprodukte.....	98
5.5	Relevanz der 3-Desoxypentosulosebildung in der Maillard-Reaktion, ausgehend von Oligosacchariden in wässriger Lösung.....	99
5.6	Einordnung der beschriebenen Mechanismen in die Gesamtheit des Abbaus von Oligosacchariden.....	100
5.7	Reaktionen von Fructosglycin im Wässrigen in Anwesenheit von OPD.....	100
5.7.1	Bildung von α -Dicarbonylen.....	101
5.7.2	Abbau des Amadoriproduktes.....	102
5.7.3	Vergleich der Amadoriprodukt- und α -Dicarbonylbildung im wässrigen Reaktionsgemisch D-Glucose/Glycin/OPD mit der α -Dicarbonylbildung aus Fructosglycin/OPD.....	103
6	Caramelisierung und Maillard-Reaktion von Dextrin 10 im wässrigen Reaktionsmilieu.....	104
6.1	α -Dicarbonylbildung während der Caramelisierung.....	105
6.2	α -Dicarbonylbildung während der Maillard-Reaktion.....	106
7	Schlussfolgerungen und Diskussion der Relevanz der Ergebnisse für das Verständnis der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden.....	107
8	Experimenteller Teil.....	113

8.1	Chromatographische und spektroskopische Methoden einschließlich Derivatisierungstechniken.....	113
8.1.1	Qualitative Dünnschichtchromatographie.....	113
8.1.2	Säulenchromatographie.....	113
8.1.3	HPTLC.....	113
8.1.4	Gaschromatographie (GC/FID).....	114
8.1.5	Gaschromatographie (GC/MS).....	114
8.1.6	Extraktion der Chinoxaline und Acetylierung.....	114
8.1.7	HPLC/DAD.....	115
8.1.8	HPAEC/PAD.....	115
8.1.9	HPLC/Fluoreszenzdetektor (Furosinanalytik).....	115
8.1.10	¹ H/ ¹³ C-NMR-Spektroskopie.....	116
8.2	Synthesen.....	116
8.2.1	Chemikalien.....	116
8.2.2	Darstellung von 2-Methyl-3-(1,2,3-trihydroxypropyl)-chinoxalin.....	116
8.2.3	Darstellung von 2-(2,3,4-Trihydroxybutyl)-chinoxalin	117
8.2.4	Darstellung von 2-(Arabino-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-chinoxalin.....	118
8.2.5	Darstellung von 2-Methyl-3-(2,3-dihydroxypropyl)-chinoxalin	119
8.2.6	Darstellung von 2-(2,3-Trihydroxypropyl)-chinoxalin.....	119
8.2.7	Darstellung von Fructosglycin.....	120
8.2.8	Darstellung von Maltulosylglycin.....	121
8.3	Thermolyse.....	121
8.3.1	Caramelisierung im quasi wasserfreien Milieu (Saccharide/OPD; GC/FID).....	121
8.3.2	Maillard-Reaktion im quasi wasserfreien Milieu (Saccharide/Glycin/OPD; GC/FID).....	122
8.3.3	Caramelisierung im von Mono- und Oligosacchariden quasi wasserfreien Milieu (D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/OPD; HPLC/DAD).....	122
8.3.4	Maillard-Reaktion von Mono- und Oligosacchariden im quasi wasserfreien Milieu (D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/Glycin/OPD; HPLC/DAD).....	122

8.3.5	Umsetzung von Fructosglycin im quasi wasserfreien Milieu (Fructosglycin/OPD; HPLC/DAD).....	123
8.3.6	Caramelisierung von Mono- und Oligosacchariden im wässrigen Milieu (0,25 M; D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/OPD; HPLC/DAD).....	123
8.3.7	Maillard-Reaktion von Mono- und Oligosacchariden im wässrigen Milieu (0,25 M; D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/Glycin/OPD; HPLC/DAD).....	123
8.3.8	Umsetzung von Fructosglycin im wässrigen Milieu (0,25 M; Fructosglycin/OPD; HPLC/DAD).....	123
8.3.9	Caramelisierung von Dextrin 10 im wässrigen Milieu (Dextrin 10/OPD; HPLC/DAD).....	123
8.3.10	Maillard-Reaktion von Dextrin 10 im wässrigen Milieu (Dextrin 10/Glycin/OPD; HPLC/DAD).....	124
8.4	Furosinbestimmung.....	124
9	Literaturverzeichnis.....	125
10	Anhang.....	133
	Abbildungsverzeichnis	143
	Tabellenverzeichnis	148
	Lebenslauf.....	162

1 Einleitung

Der Begriff der nichtenzymatischen Bräunung umfasst neben der Bräunung von Ascorbinsäure und der oxidativen Polymerisation von Lipiden als wichtigste Reaktionen die Caramelisierung und die Maillard-Reaktion.

Unter Caramelisierung versteht man die Entwicklung eines charakteristischen Aromas (Karamelgeruch, -geschmack) beim Erhitzen von Zuckern oberhalb ihres Schmelzpunktes. Dieser Prozess wird durch die Bildung honiggelber, später dunkelbrauner Substanzen begleitet (Belitz und Grosch, 1992).

Die Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und Aminosäuren wurde zuerst von dem französischen Wissenschaftler L. C. Maillard beschrieben. Er beobachtete eine Bräunung bei der Reaktion von Zuckern mit Aminosäuren, wobei die braunen Reaktionsprodukte mit fortschreitender Reaktionszeit wasserunlöslich wurden (Maillard, 1912).

Da fast alle Lebensmittel Kohlenhydrate und Aminosäuren bzw. Proteine enthalten, spielt diese Reaktion eine zentrale Rolle für die Herstellung, Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln.

Sie führt zur Bildung von erwünschten Aromen und von Farbe, so z. B. beim Rösten von Kaffee oder bei der Herstellung von Malz. Auch beim Backen und Braten entstehen durch die Maillard-Reaktion der produkt-typische Geruch und die ansprechende Farbe der Kruste (Baltes, 1980 und 1986).

Die Bildung von antioxidativen niedrig- und hochmolekularen Stoffen kann zur Erhöhung der Haltbarkeit und Lagerstabilität von Lebensmitteln beitragen (Nicoli et al., 1997, Cämmerer et al., 1999).

Neben den genannten positiven Effekten ist die Verringerung des verfügbaren Lysins in thermisch behandelten Milcherzeugnissen durch die Reaktion von reduzierenden Zuckern mit der ϵ -Aminogruppe der Aminosäure eine unerwünschte Begleiterscheinung der Maillard-Reaktion. Neben angenehmen Aromen können auch unerwünschte Geruchs- und Geschmacksnoten während der Maillard-Reaktion entstehen. Außerdem entstehen beim Braten von Fleisch heterocyclische Amine, die im Verdacht stehen, eine cancerogene Wirkung zu haben (Skog und Jagerstad, 1994).

Aber nicht nur in Lebensmitteln hat die Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren und Proteinen einen großen Stellenwert. Im lebenden Organismus bewirkt die Maillard-Reaktion eine Vernetzung von Proteinen, was zur Alterung von Zellen und dadurch des Gewebes führt. Folgen dieser Reaktion sind Krankheiten wie Arteriosklerose und grauer Star, die besonders gehäuft bei Diabetispatienten auftreten (Monnier und Sell, 1994, Orthwerth et al., 1994). In der aktuellen Literatur wird ein Rezeptor für die fortgeschrittenen Produkte der Glycosidierung (AGEs) beschrieben. Die Bindung eines AGE an diesen Rezeptor (RAGE) hat weitgehende physiologische Folgen. So löst er z. B. oxidativen Stress und eine Reihe anderer biochemischer Reaktionen in der Zelle aus (Schmidt und Stern, 1994, Pischetsrieder und Schmidt, 1998).

1.1 Charakterisierung und Grundlagen der nichtenzymatischen Bräunung

Die Maillard-Reaktion umfasst eine große Zahl von überaus komplexen Reaktionsmechanismen. In den fünfziger Jahren publizierte Maillon (1981) eine Übersicht und Strukturierung der Maillard-Reaktion, die bis heute in großen Teilen Gültigkeit besitzt. Er gliederte die Maillard-Reaktion in drei Abschnitte:

Die frühe Phase,

- in der reduzierender Zucker und Aminosäure zum N-Glycosid kondensieren und sich nach Keto-Enol-Umlagerung das Amadori- bzw. Heynsprodukt bildet.

Die fortgeschrittene Phase,

- in der durch Dehydrierung, Eliminierung, Cyclisierung und Fragmentierung des Amadori- oder Heynsproduktes sowie durch den Strecker-Abbau der Aminosäure Heterocyclen, Reduktone, Aldehyde und andere Spaltprodukte entstehen (Namiki, 1988; Ledl, 1990; Ledl und Schleicher, 1990).

In diesem Abschnitt der Maillard-Reaktion entstehen viele aromawirksame Substanzen und ihre Vorläufer.

Die finale Phase,

- in der es durch Aldolkondensation und Polymerisation zur Ausbildung von hochmolekularen, z. T. wasserunlöslichen, braunen Verbindungen, den Melanoidinen, kommt.

Die Struktur der Melanoidine ist noch weitgehend unbekannt. Die Auffassung, dass es sich bei den Melanoidinen um Polymere mit einheitlicher Struktur handelt (Kato und Tsuchida, 1981), weicht mehr und mehr der Erkenntnis, dass Melanoidine hochmolekulare Stoffe sind, die wahrscheinlich aus einem relativ regelmäßigen Grundgerüst (Cämmerer und Kroh, 1995) bestehen. Das individuelle Erscheinungsbild des Melanoidins wird dann durch eine Vielzahl von Reaktionen bestimmt, die kleinere Strukturen an den Grundkörper binden. Dabei kann es sich um Chromophore, wie von Hofmann et al. (1999) beschrieben, handeln oder auch um kleinere polymere Strukturen, wie die von Tressl et al. (1998) gefundenen Ketten aus N-substituierten Pyrrolen.

Bei der Caramelisierung sind die einzelnen Abschnitte nicht so klar gegliedert. Wie bei der Maillard-Reaktion erfolgt eine Aktivierung auch hier durch Enolisierung, anschließender Dehydratisierung des Zuckermoleküls und Fragmentierung. Aus den reaktiven Intermediaten bilden sich aromawirksame Heterocyclen und im fortgeschrittenen Stadium braune Pigmente.

1.1.1 Aldosen, Ketosen und Oligosaccharide als Ausgangsstoffe für die nichtenzymatische Bräunung

Die Geschwindigkeit der nichtenzymatischen Bräunung hängt u. a. von den Eigenschaften der Ausgangsstoffe ab. Im Allgemeinen ist die Rangfolge der Reaktivität der Monosaccharide: Aldopentose > Aldohehexose > Ketohehexose > Disaccharide (Spark, 1969). Obwohl anerkannt ist, dass die Aldehydfunktion der Aldosen reaktiver ist als die Keto-Funktion der Ketosen, gibt es auch Veröffentlichungen, die von einer höheren Reaktivität der D-Fructose gegenüber der D-Glucose berichten (Suarez et al., 1995, Mauron, 1981).

Die Erscheinungsform der Carbonylgruppe in einem Monosaccharid hat einen wichtigen Einfluss auf seine Reaktivität. In ihrer halbacetalisch gebundenen Form ist die Carbonylgruppe weniger reaktiv als in der offenkettigen Form, da der -I-Effekt des Sauerstoffs der Carbonylgruppe in der cyclischen Form des Zuckers abgeschwächt ist.

Während 0,4-2 % der D-Fructose in offenkettiger Form vorliegen (Swenson und Barker, 1971, Avigad et al., 1970), ist es bei D-Glucose mit 0,003 % (Shallenberger und Birch, 1975) ein beträchtlich geringerer Teil in der Aldehydform vorhanden.

Neben der verstärkt vorliegenden offenkettigen Form wird auch der furanoiden Konformation der D-Fructose eine höhere Reaktivität zugeordnet, da sie eine höhere Ringspannung als die pyranoide Anordnung der D-Glucose hat und der Ringsauerstoff seinerseits eine höhere Basizität besitzt (Steber, 1987).

Naranjo et al. (1998) verglichen die Abnahme von verfügbarem Lysin in Reaktionsgemischen mit D-Glucose, D-Fructose, Maltose oder Lactose. In Reaktionsgemischen mit D-Fructose fanden sie bei niedrigeren Temperaturen eine geringere Abnahme des Lysins als bei den Aldosen.

Die Autoren erklären diese Beobachtung damit, dass bei den Aldosen hauptsächlich eine Umwandlung von einer Pyranoseform in die andere, also Mutarotation, stattfindet. Im Gegensatz dazu beinhaltet die Tautomerisierung von D-Fructose auch in beträchtlichem Umfang die Umwandlungen in die Furanoseform. Diese Umwandlungen sind wesentlich komplexer und stark temperaturabhängig (Wertz, 1981, Cockman, 1987), wodurch sich die höhere Aktivierungsenergie erklärt.

Neben den unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, die zu teilweise widersprüchlichen Aussagen über die Reaktivität von D-Fructose und D-Glucose führen kann, kann auch die Auswahl der Kriterien für die Reaktivität unterschiedliche Ergebnisse zur Folge haben. Die Erhöhung eines gemessenen Parameters bedeutet nicht zwangsläufig auch eine höhere Reaktivität des Saccharids bezüglich anderer Parameter für das Ausmaß der nichtenzymatischen Bräunung.

In Bezug auf die HMF-Bildung steht der D-Fructose z. B. ein zusätzlicher Reaktionsweg zur Verfügung. Durch Wasserabspaltung aus der furanoiden Konformation kann ohne Ringöffnung direkt Hydroxymethylfurfural entstehen (Ponder und Richards, 1993). D-Fructose ist so zwar bei der Bildung dieser heterocyclischen Verbindung reaktiver als Glucose, übt aber nicht auf alle anderen Teilaspekte der nichtenzymatischen Bräunung gleichmäßig Einfluss aus.

Über die Reaktivität von Di- und Oligosacchariden im Vergleich zu Monosacchariden ist relativ wenig bekannt, da Oligosaccharide bisher nur selten Gegenstand der Forschung waren.

Wedzicha und Kedward (1995) fanden bei ihren kinetischen Untersuchungen, dass die Substituenten an C4 bei α -1 \rightarrow 4-Glucanen keinen Einfluss auf die

Reaktivität der reduzierenden OH-Gruppe haben. Einzig die geringere Konzentration der Carbonylgruppen in Oligosaccharidgemischen (Ausnahme Maltose) sollte für eine langsamere Reaktion verantwortlich sein.

Wie Wedzicha und Kedward (1995) nehmen auch Kramhöller et al. (1993) für die einleitenden Reaktionsschritte der nichtenzymatischen Bräunung von Oligosacchariden den gleichen Ablauf wie für Monosaccharide, über das Amadoriprodukt, an. Allerdings hat ihrer Meinung nach der Substituent einen großen Einfluss auf die weiteren Reaktionsabfolgen.

So führt die Reaktion der 1-Desoxyhexosulose im Falle der D-Glucose über das enolisierte Halbacetal ((4-Hydroxy-5,6-dihydro-2-methyl-2,3,5-trihydroxy-2H-pyran) zu Hydroxymaltol.

Bei Maltose und Oligosacchariden entsteht auf Grund der glycosidischen Bindung an C4 das 4-(α -D-glucosyloxy)-5,6-dihydro-2-methyl-2,3,5-trihydroxy-2Hpyran, das zu Maltol weiterreagiert (s. Abb. 14 in 1.1.5.).

Für das Ausmaß der ablaufenden Reaktionen spielt natürlich die Konzentration der Carbonylgruppen im Ausgangsstoff eine bedeutende Rolle. So wird für die Stärke selbst eine sehr geringe Reaktivität in der nichtenzymatischen Bräunung angenommen. Spaltungsreaktionen müssen zunächst die lange Saccharidkette zergliedern. Die entstehenden kürzerkettigen Oligosaccharide können dann leichter im Sinne der nichtenzymatischen Bräunung reagieren.

Der Substituent am D-Glucosemolekül hat allerdings einen Einfluss auf das Produktspektrum.

1.1.2 Frühe reaktive Intermediate in der Maillard-Reaktion

In der frühen Phase der Maillard-Reaktion wird durch den nucleophilen Angriff der Aminosäure an der Carbonylgruppe eines reduzierenden Zuckers ein N-substituiertes Glycosylamin gebildet. Westphal und Kroh (1985a,b) haben die Bildung und Abreaktion des N-Glycosides ausführlich diskutiert und dabei festgestellt, dass die Bildung des Amadoriproduktes aus Aldosen verstärkt über die β -pyranoide Form des N-Glycosides verläuft. Die N-Glycoside sind relativ stabil, wenn sie sich von aromatischen und heterocyclischen Aminen ableiten (Ledl und Schleicher, 1990). Die von Aminosäuren gebildeten dagegen lagern sich, wie Abb. 01 zeigt, über das Enaminol rasch zu den entsprechenden

Aminoketosene (Amadoriprodukte) um oder werden hydrolytisch in die Ausgangsstoffe gespalten.

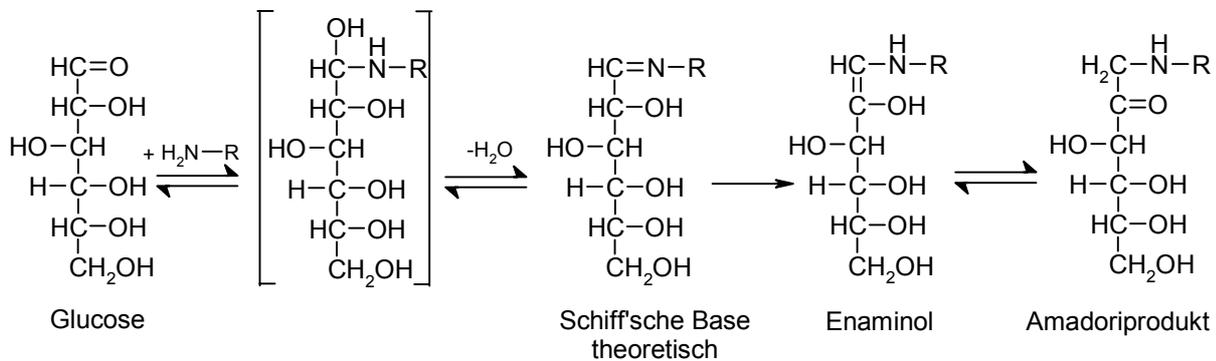


Abb. 01 Bildung des Amadoriproduktes über das N-Glycosid (Die folgenden Reaktionsschemata zeigen vereinfachend die Hexosen in der offenkettigen Form. Tatsächlich liegen die Zucker und ihre Abbauprodukte jedoch in der cyclischen Halbacetalform vor.)

Bei Ketosen verläuft die Reaktion über das Ketosylamin wobei es zur Bildung einer Aminoaldose kommt (Heyns, 1957). Diese Verbindung wurde nach ihrem Entdecker als Heynsprodukt bezeichnet.

In der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion kommt es durch Keto-Enol-Umlagerungen zur Bildung des 1,2-Enaminols bzw. des 2,3-Endiols. Diese Verbindungen können durch vinyloge β -Eliminierung Wasser abspalten, und es entstehen auf diesem Wege α -Dicarbonylverbindungen wie die 3-Desoxyhexosulose, 1-Desoxyhexosulose und die 1,4-Didesoxyhexosulose (s. 1.1.4.).

Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur entstehen durch Retro-Aldolreaktion aus dem Amadoriprodukt und der (theoretisch formulierbaren) Schiff'schen Base (s. 1.1.4.). Daneben kommt es auch zur basenkatalysierten Fragmentierung des Zuckermoleküls, wobei sich wiederum α -Dicarbonyle bilden, u. a. Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl.

Als direkter Precursor für die Bildung der Desoxyhexosulosen wird zumeist das Amadoriprodukt angegeben (Beck et al., 1988, Ledl und Schleicher, 1990). Allerdings ist schon das 1,2-Enaminol in der Lage, die 3-Desoxyhexosulose zu bilden. Auch andere Verbindungen mit α -Dicarbonylstruktur können bereits aus Vorstufen des Amadoriproduktes gebildet werden.

als die Maillard-Reaktion, d. h. bei Temperaturen über 140 °C oder in Gegenwart von Säuren (Ledl, 1987).

Dabei kommt es bei der thermischen Behandlung von D-Glucose zur Enolisierung der Aldehydfunktion an C1.

Die Möglichkeit zur protonenkatalysierten vinylogen β -Eliminierung von Wasser aus dem resultierenden 1,2-Endiol führt, wie Abb. 03 zeigt, zur Bildung von 3-Desoxyhexosulose. Erneute vinyloge β -Eliminierung an der 2,3-Enolstruktur ergibt eine 3,4-Didesoxyhexosulose, die nach Cyclisierung und Wasserabspaltung zu Hydroxymethylfurfural (HMF) reagiert.

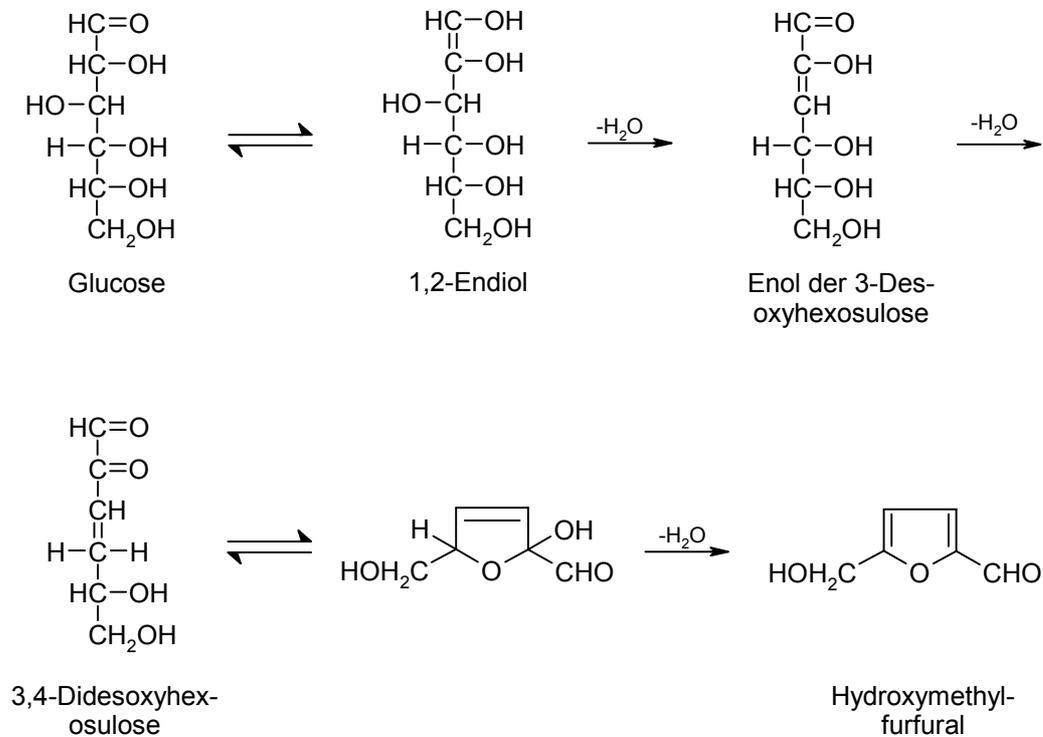


Abb. 03 Bildung von Hydroxymethylfurfural (HMF) aus D-Glucose (nach Baltes, 1995)

Für die Bildung von Hydroxymethylfurfural aus Oligosacchariden schlägt Kroh (1994) die Bildung der 3-Desoxyhexosulose am reduzierenden Ende vor. Bei einer weiteren vinylogen β -Eliminierung spaltet sich die nun entstandene 3,4-Dideoxyhexosulose vom glycosidischen Rest ab. Wie bereits beschrieben führen dann Cyclisierung und Dehydratisierung zu HMF.

Unter Maillard-Reaktionsbedingungen wird mehr HMF gefunden als in der Caramelisierung, was durch mehrere durch das Amin bedingten konkurrierenden Reaktionen erklärt werden kann (Häseler, 2000).

Für Pentosen kommt es auf dem gleichen Reaktionsweg zur Bildung von Furfural.

Durch die Lobry de Bruyn-Alberda-van-Ekenstein-Umlagerung (in Gegenwart von Basen) kann es auch während der Caramelisierung zur Ausbildung der 2,3-Endiolstruktur kommen. Aus D-Fructose mit der Carbonylgruppe an C2 wird dieses Endiol durch einfache Enolisierung leichter gebildet als aus D-Glucose. Durch vinyloge β -Eliminierung würde die 1-Desoxyhexosulose entstehen. Ledl (1987) beschreibt den Zuckerabbau während der Caramelisierung allerdings hauptsächlich über die 3-Desoxyhexosulose und 4-Desoxyhexosulose. Die Abbauprodukte der 1-Desoxyhexosulose konnte er jedoch nur in Gegenwart von Amin in nennenswerten Mengen finden.

Weitere wichtige Reaktionsprinzipien innerhalb der Caramelisierung sind Fragmentierungsreaktionen wie die α -Dicarbonylsplaltung, deren Produkte Säuren und Aldosen sind, sowie die Retro-Aldolreaktion. Daneben können auch radikalische Reaktionen und Aldolreaktionen ablaufen (Kroh, 1994).

Neben der Bildung von reaktiven Intermediaten, die zu aromawirksamen Heterocyclen und gefärbten Substanzen weiterreagieren, kommt es während der Caramelisierung auch zur Bildung von weniger reaktiven Verbindungen. Tschiersky und Baltes (1989) weisen in Caramel die Bildung von Reversionszuckern wie Trehalose, Cellobiose, Maltose und Isomaltose nach. Außerdem berichten sie auch über die Bildung von 1,6-Anhydroglucose und Difructose-dianhydriden. Anhydrozucker erweisen sich als relativ inerte Verbindungen und zeigen nur eine sehr geringe Bräunungsaktivität.

Kroh et al. (1996) schlussfolgerten aus ihren Untersuchungen zur trockenen Thermolyse von D-Glucose und Oligosacchariden, dass die gefundenen Anhydrozucker und Transglycosidierungsprodukte aus dem Glycosylkation entstehen (Abb. 04). Bei der Transglycosidierung reagiert das Glycosylkation mit den Hydroxylgruppen anderer Saccharide. Je nach sterischer Bevorzugung oder Hinderung werden neue glycosidische Bindungen geknüpft. Die entstandenen Transglycosidierungsprodukte haben in Abhängigkeit von ihrem Schmelzpunkt ein vergleichbares Bräunungspotenzial wie die Ausgangsstoffe.

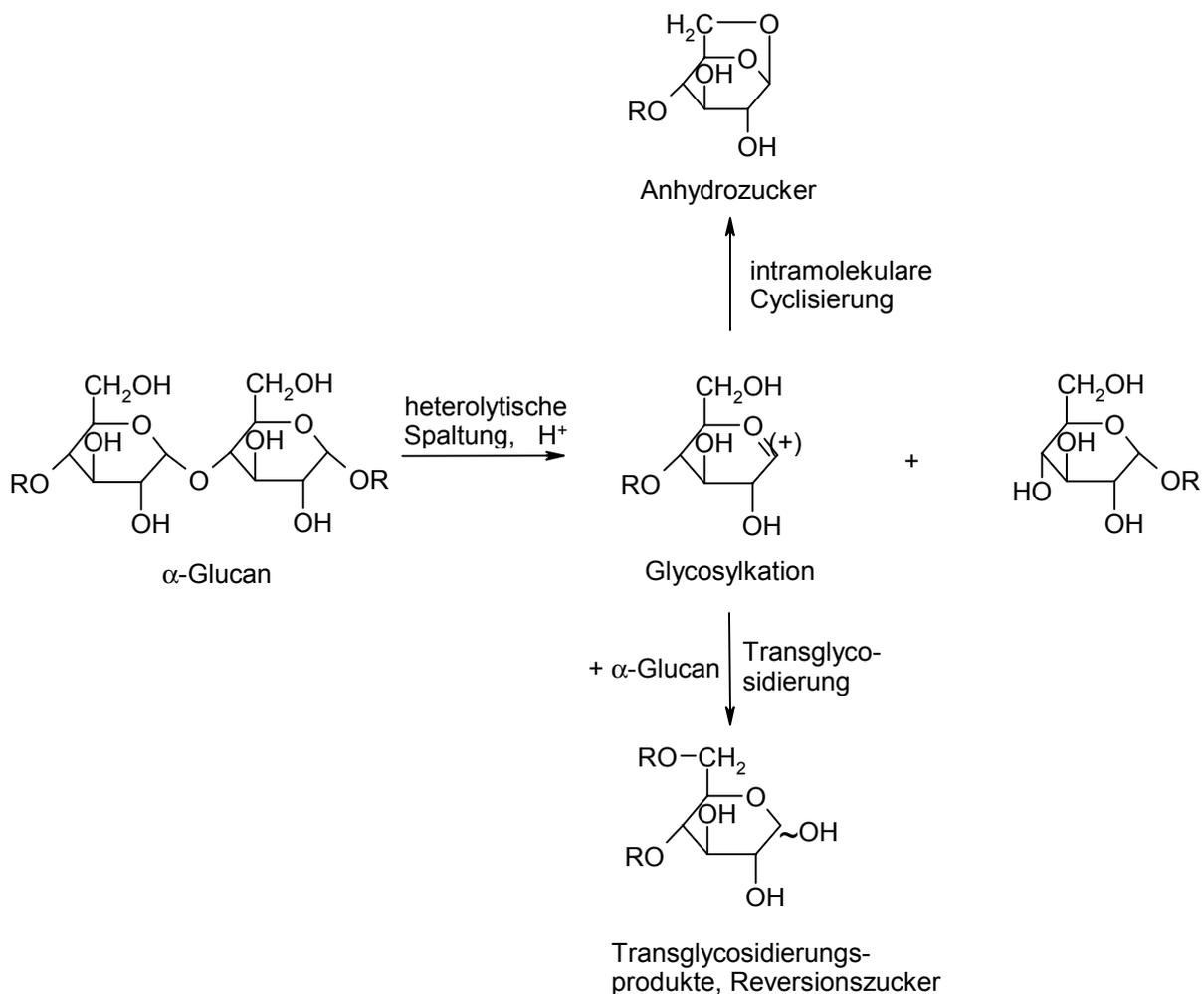


Abb. 04 Bildung von Anhydrozuckern und Transglycosidierungsprodukten über das Glycosylkation aus α -Glucanen (R= H, α -Glucan; nach Kroh et al., 1996)

1.1.4 Bildungswege von Hexosulosen und Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur

α -Dicarbonylverbindungen sind die wichtigsten Precursoren für die Bildung von aromaaktiven Heterocyclen und Melanoidinen.

Hexosulosen können aus dem Amadoriprodukt sowie dessen Vorstufen entstehen (s. auch 1.1.2). Dabei ist es wichtig, dass sich durch Keto-Enol-Tautomerisierung eine Endiol- oder Enaminolstruktur ausbildet. Aus diesen Strukturen wird dann durch die vinyloge β -Eliminierung, die sowohl säuren- als auch basenkatalysiert sein kann, die allylständige Hydroxylgruppe als Wasser abgespalten. Durch den Austritt des Wassers bildet sich dann eine weitere Doppelbindung im Molekül

(Feather und Harris, 1973). Abb. 05 illustriert diesen Mechanismus am Beispiel der 3-Desoxyhexosulose.

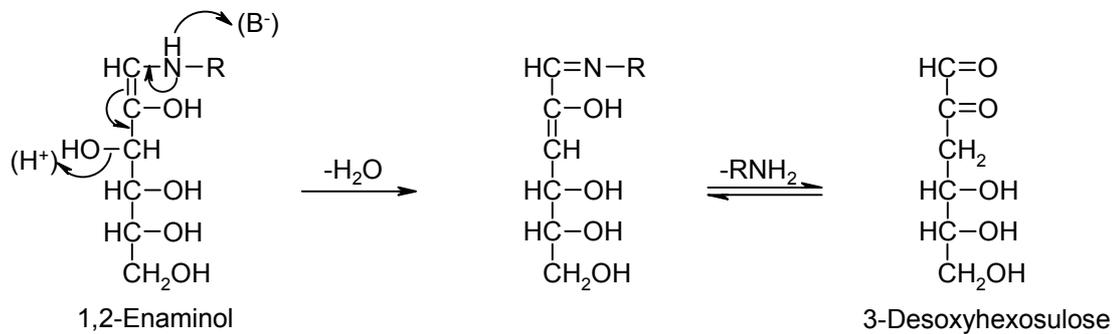


Abb. 05 Bildung von 3-Desoxyhexosulose durch vinyloge β -Eliminierung

In vivo werden für die Entstehung von 3-Desoxyhexosulose außerdem Reaktionswege vorgeschlagen, die von D-Fruktose und D-Fruktose-3-phosphat ausgehen (Kato et al., 1969, Szwegold et al., 1990, Lal et al., 1995).

Im Gegensatz dazu entstehen, wie in Abb. 06 skizziert, aus der 2,3-Endiolform des Amadoriproduktes auf dem analogen Reaktionsweg die 1-Desoxyhexosulose und die 1-Amino-1,4-didesoxyhexosulose (Ledl et al., 1986).

Wie in Abb. 02 beschrieben, gehen beim Strecker-Abbau aus α -Dicarbonylstrukturen erneut Endiolstrukturen hervor. Im Falle der 4- bzw. der 1-Desoxyhexosulose führt das zur Ausbildung des 2,3-Endiols, so dass eine vinyloge β -Eliminierung ablaufen kann in deren Verlauf es zur Bildung von 1,4-Didesoxyhexosulose kommt (Nedvidek, 1992a, Abb. 06).

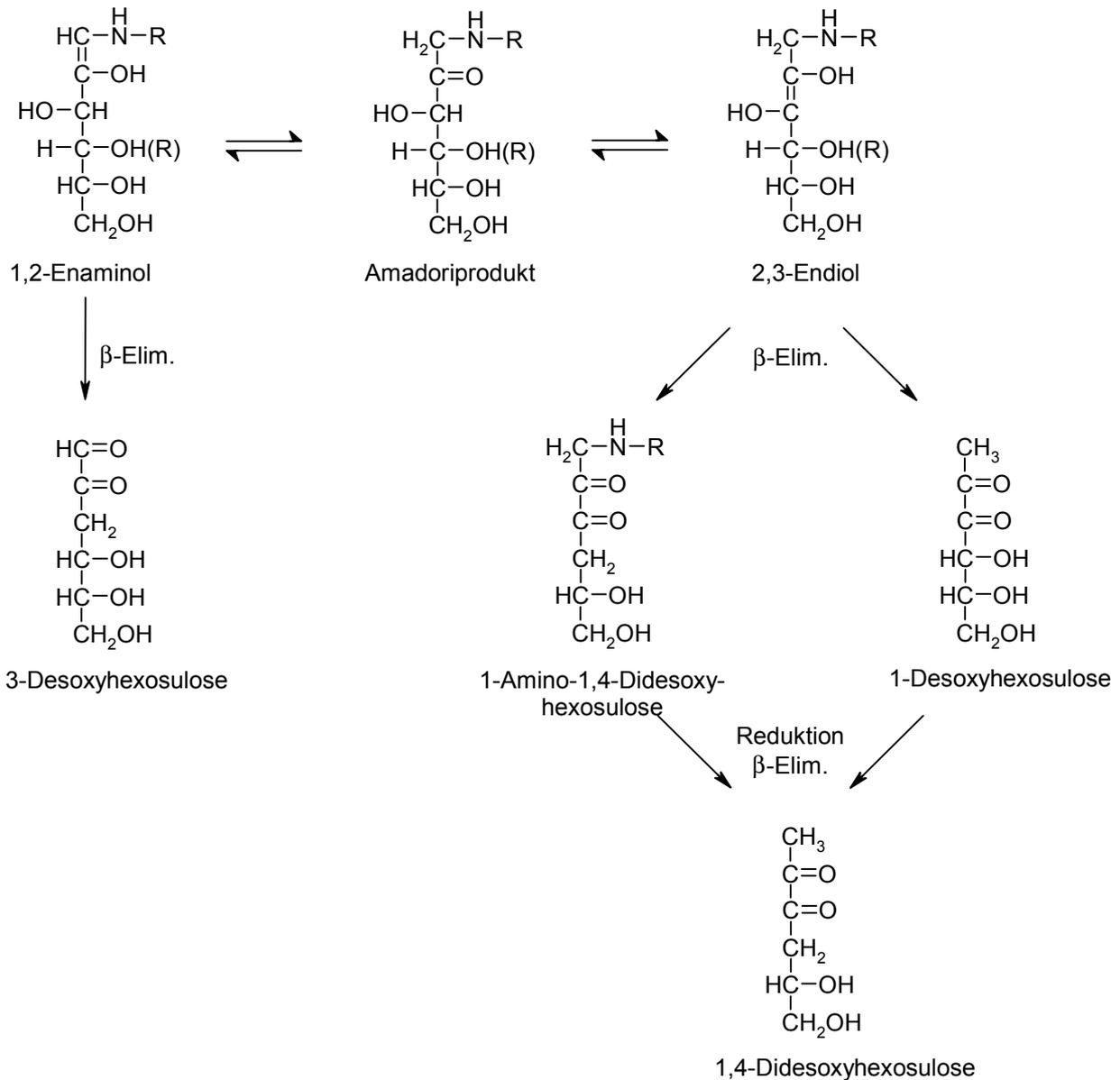


Abb. 06 Schematische Darstellung der Bildung von Desoxyhexosulosen R= H, Saccharid (β -Elim. = vinyloge β -Eliminierung)

Aus dem Amadoriprodukt der D-Glucose entsteht unter oxidativen Bedingungen ein weiteres α -Dicarbonyl, das Glucoson. Die Autoxidation, beschrieben in Abb. 07, verläuft als eine Radikal-Kettenreaktion und wird durch Kupfer(II)-Ionen katalysiert (Liedke und Eichner, 1998). Auf Grund des pH-Optimums im neutralen Bereich und mittels Katalyse durch Übergangsmetallionen bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen spielt die Bildung von Hexosonen besonders bei der Lagerung von Lebensmitteln oder in physiologischen Systemen eine bedeutende Rolle. Erst bei höheren Temperaturen laufen verstärkt konkurrierende Enolisierungsreaktionen ab (Kawakishi et al., 1994, Liedke und Eichner, 1998).

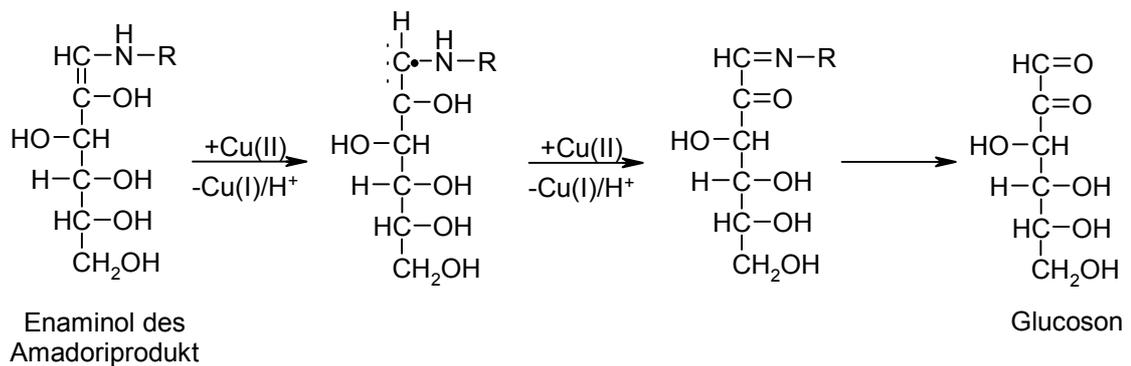


Abb. 07 Autoxidativer Abbauweg der Amadori-Verbindung zum Glucoson (Liedke und Eichner, 1998)

Neben den Hexosulosen haben auch Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur einen wichtigen Anteil an der Bildung von Aromastoffen und dem Verknüpfen von Prämelanoidinen oder Proteinen durch cross-link-Reaktionen.

Für die Entstehung dieser Fragmente mit zwei bis vier Kohlenstoffatomen wurden verschiedene Abbauege aus Intermediaten der Maillard-Reaktion vorgeschlagen.

Glyoxal kann aus Glucoson durch Spaltung zwischen C2 und C3 entstehen. Hofmann et al. (1999) erklären damit die frühe und sauerstoffabhängige Bildung von Glyoxal in Maillard-Reaktionsgemischen.

Des Weiteren kann Glyoxal durch die Spaltung des Saccharidgrundgerüsts auf dem Wege der Retro-Aldolspaltung entstehen.

Durch eine Aminkatalyse kommt es unter neutralen bis schwach sauren Bedingungen, durch Retro-Aldolreaktion der Schiff'schen Base, zu einem Bindungsbruch zwischen C2 und C3. Das entstandene Glycolaldehydimin kann mit einem weiteren Molekül zum Pyrazinradikal kondensieren, das an der Braunfärbung in der frühen Phase der Maillard-Reaktion beteiligt ist (Hayashi und Namiki, 1981). Oxidation des Glycolaldehydimins führt zum Glyoxalmonoimin, das nach hydrolytischer Spaltung Glyoxal freisetzt (s. Abb. 08).

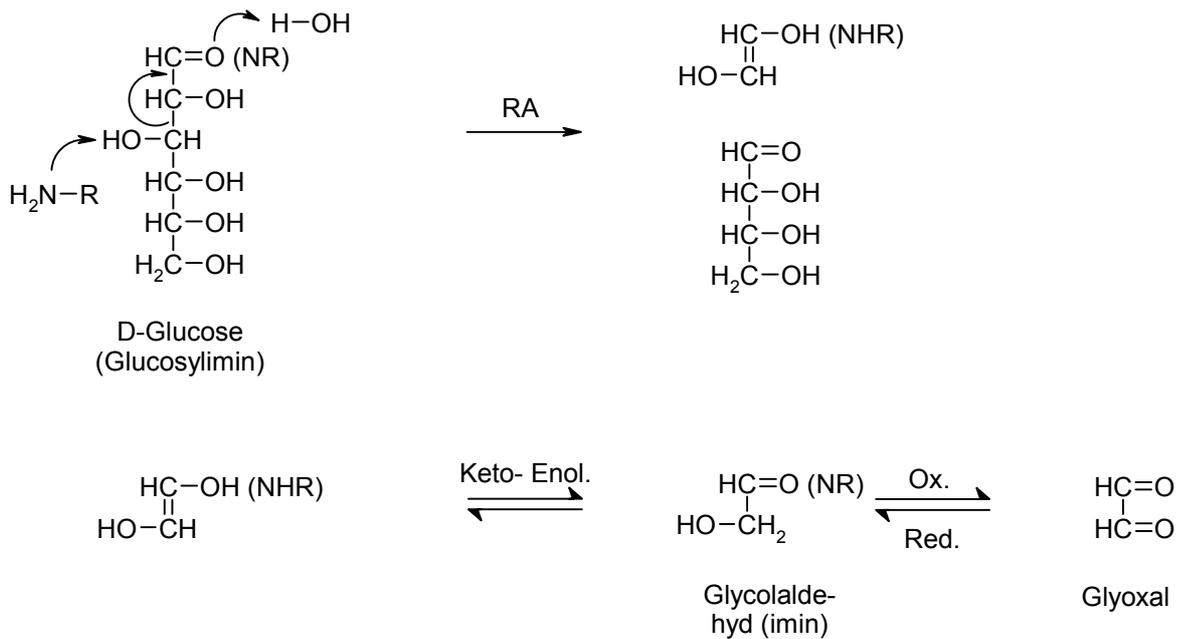


Abb. 08 Basenkatalysierte Retro-Aldolreaktion von D-Glucose und Bildung von Glyoxal in Anlehnung an Hayashi et al. (1985) (RA= Retro-Aldolreaktion; Keto-Enol.=Keto-Enol-Tautomerisierung)

Für die Bildung von *Methylglyoxal* werden ebenfalls verschiedene Reaktionswege vorgeschlagen.

Sowohl beim Amadoriprodukt als auch bei der 1-Desoxyhexosulose leitet eine Retro-Aldolreaktion den Bindungsbruch zwischen C3 und C4 ein. Anschließende Dehydratisierungsreaktionen führen zum Methylglyoxal. Abb. 09 zeigt einen Reaktionsweg, bei dem die Carbonylgruppe an C2 des Amadoriproduktes ebenfalls aminiert wird, was die Fragmentbildung schon bei neutral bis schwach basischem pH-Wert ermöglicht (Hayashi et al., 1986a).

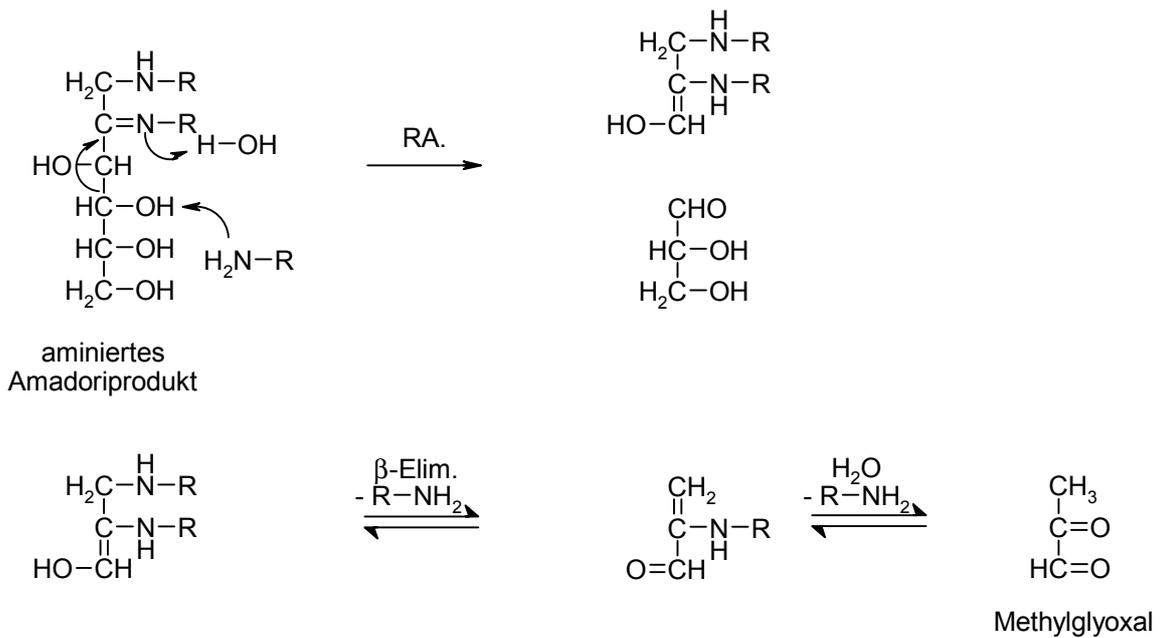


Abb. 09 Retro-Aldolreaktion des aminierte Amadoriproduktes (Hayashi et al., 1986) (RA= Retro-Aldolreaktion; β -Elim. = vinyloge β -Eliminierung)

Aus 1-Desoxyhexosulose entsteht Methylglyoxal auf unterschiedlichsten Wegen. So kann Methylglyoxal durch Retro-Aldolreaktion aus der offenkettigen Form direkt entstehen (Abb. 10).

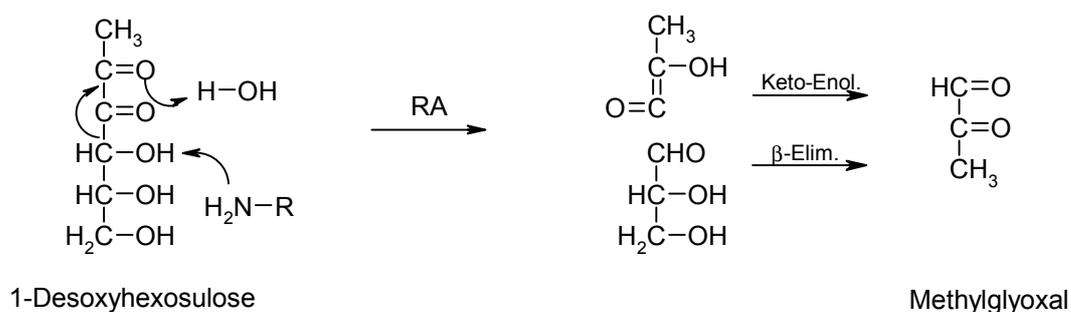


Abb. 10 Retro-Aldolreaktion von 1-Desoxyhexosulose (Keto-Enol.= Keto-Enol-Tautomerisierung, weitere Abkürzungen s. Abb. 08)

Kim (1994) erhielt ebenfalls Methylglyoxal als sie γ -Pyranon (2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-on), ein Abbauprodukt der 1-Desoxyhexosulose, in wässriger Lösung erhitzte. Die Spaltung der Kohlenstoffkette wurde hier als α -Dicarbonylspaltung oder Retro-Aldolreaktion beschrieben (Abb. 11).

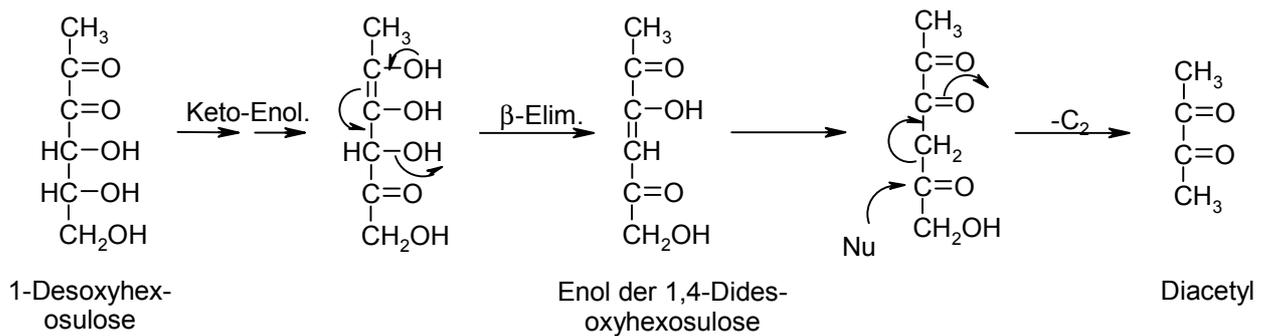


Abb. 12 Bildung von Diacetyl aus 1-Desoxyhexosulose (Weenen, 1996) (Abkürzungen s. Abb. 08 und 09)

Auf der Grundlage ihrer Untersuchungen an γ -Pyranon postuliert Kim (1994) ebenfalls einen Reaktionsweg von der 1-Desoxyhexosulose zum Diacetyl, wobei das Kohlenstoffgerüst durch Retro-Aldolreaktion wiederum zwischen C4 und C5 gespalten wird (Abb. 13). Durch Strecker-Abbau oder andere reduzierende Reaktionsschritte entsteht nun erneut eine 2,3-Endiolstruktur im Zuckerfragment. Die vinyloge β -Eliminierung von Wasser mündet dann in die Bildung von Diacetyl.

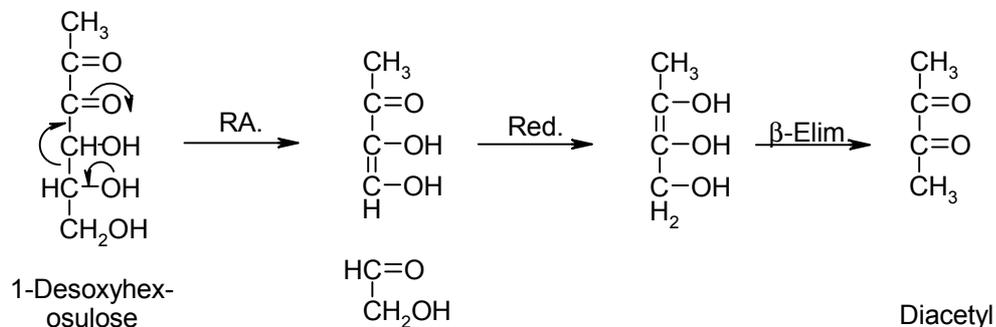


Abb. 13 Bildung von Diacetyl aus 1-Desoxyhexosulose in Anlehnung an Kim (1994) (Red. = Reduktion, weitere Abkürzungen s. Abb. 08 und 09)

Auch Huyghues-Despointes und Yaylayan (1996) belegten durch Umsetzungen von isotoopenmarkierter D-Glucose bzw. dem daraus folgenden Amadoriprodukt, dass die Retro-Aldolreaktion ein wichtiger Mechanismus bei der Bildung von C4-Fragmenten ist. Zwar ergeben diese Untersuchungen für den Abbau des Amadoriproduktes, dass 70% aller detektierten C4-Fragmente (nicht nur Diacetyl) durch Bindungsspaltung zwischen C2 und C3 gebildet werden. Für die Bildung von Zuckerfragmenten analog zu Hydroxybutan-2,3-dion (s. Abb. 13)

schlagen jedoch auch diese Autoren eine Reaktion über Retro-Aldolreaktion zwischen C4 und C5 vor.

1.1.5 Struktur, Abbauwege und Relevanz der α -Dicarbonyle

Die Struktur einer Desoxyhexosulose wirkt sich auf ihre Stabilität/Reaktivität sowie auf die Art der aus ihr gebildeten Heterocyclen aus. Für 3-Desoxyhexosulose in wässriger Lösung schlugen Ledl und Schleicher (1990) ein Gleichgewicht zwischen vier cyclischen Formen vor. Für die 1-Desoxyhexosulose empfahlen sie ein Gleichgewicht zwischen drei Heterocyclen.

Weenen und Mitarbeiter (1992, 1998) untersuchten mit Hilfe von ^{13}C -NMR die Verteilung der Isomeren von reiner 3-Desoxyhexosulose. Da sie im IR-Spektrum keine Absorption für eine C=O-Bindung messen konnten, schlussfolgerten sie, dass die Carbonylgruppen als Hydrate oder Halbacetal/ Halbketal vorliegen. In Übereinstimmung mit den erhaltenen NMR-Signalen halten die Autoren die in Abb. 14 dargestellten mono- und bicyclische Strukturen für wahrscheinlich.

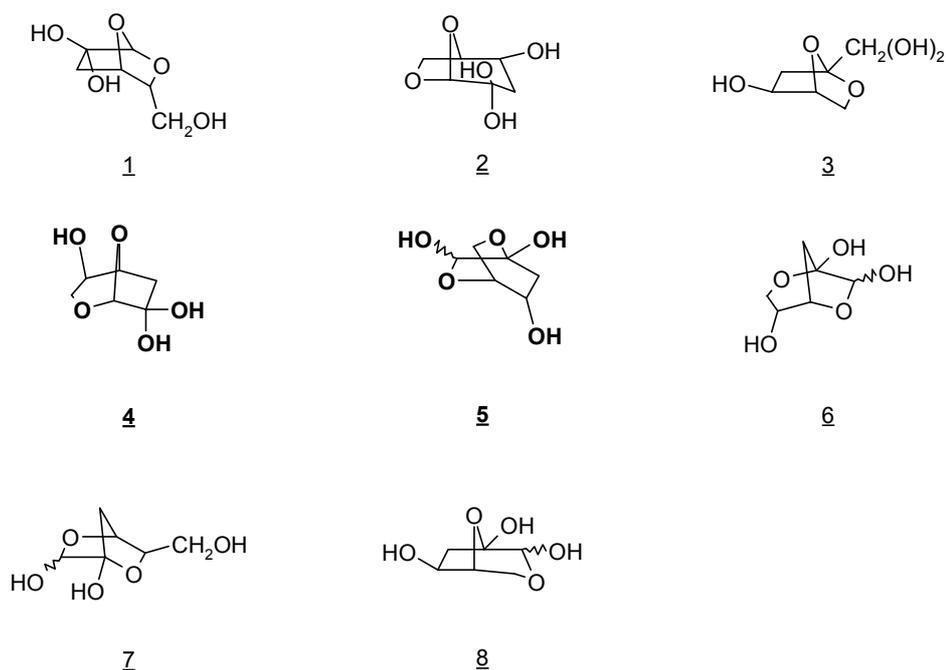


Abb. 14 Bicyclische Strukturen der 3-Desoxyhexosulose (Weenen, 1998)

Aufgrund der erhaltenen NMR-Spektren vermuten die Autoren, dass die Strukturen 4 und 5 in der wässrigen Lösung von 3-Desoxyhexosulose vorherrschen.

Aus der cyclischen Form können die Desoxyhexosulosen direkt zu aromatischen Heterocyclen weiterreagieren. Allerdings ist es für eine Abfangreaktion mit aminhaltigen Reagenzien notwendig, dass beide Carbonylgruppen leicht zugänglich sind. Deshalb ist es wichtig, dass sich die bicyclischen Strukturen wieder leicht in die offenkettige Form überführen lassen und dass die Abfangreaktion sehr schnell verläuft (s. 1.2.).

Beim Abbau der Desoxyhexosulosen können durch Cyclisierung und Wasserabspaltung verschiedenste Heterocyclen entstehen (Abb. 15).

Aus der 1-Desoxyhexosulose 9 bildet sich nach Ringschluss zwischen C2 und C6 das Halbacetal 10. In Abhängigkeit von der Substitution an C4 (R=H, Glycosyl) entsteht aus Monosacchariden durch Abspaltung der Hydroxylgruppe an C2 das Hydroxymaltol 11, während Oligo- und Disaccharide in Abhängigkeit vom glycosidisch gebundenen Zucker zu Maltol 12 im Falle von Maltose (Patton, 1950) oder zu β -Galactosylisomaltol 14 im Falle von Lactose (Hodge und Nelson, 1961) reagieren.

Furanon 13 entsteht aus 1-Desoxypentosulosen (R=H) und spielt bei deren Bräunung eine maßgebliche Rolle. Für R=CH₃ lässt sich auf 6-Desoxyzucker als Vorläufer für Furanon 13 schließen.

Eine sehr reaktive Furanverbindung, die sich aus der Struktur 10 ableitet, ist das Acetylformoin 15. Diese Substanz wird aus der Pyranform von 10 durch vinyloge β -Eliminierung der Hydroxylgruppe an C6 gebildet und ist auf Grund ihrer hohen Reaktivität im Lebensmittel maximal in Spuren nachweisbar.

Eine ähnliche Struktur wie 15 erhält man auch in Umsetzungen von Disacchariden mit primären und sekundären Aminen. Dabei bleibt der glycosidische Rest (R) im Molekül erhalten. Durch Reaktion der Carbonylgruppe mit dem Amin kommt es zur Bildung von Pyrolinon 16, Ledl und Fritsch, 1984).

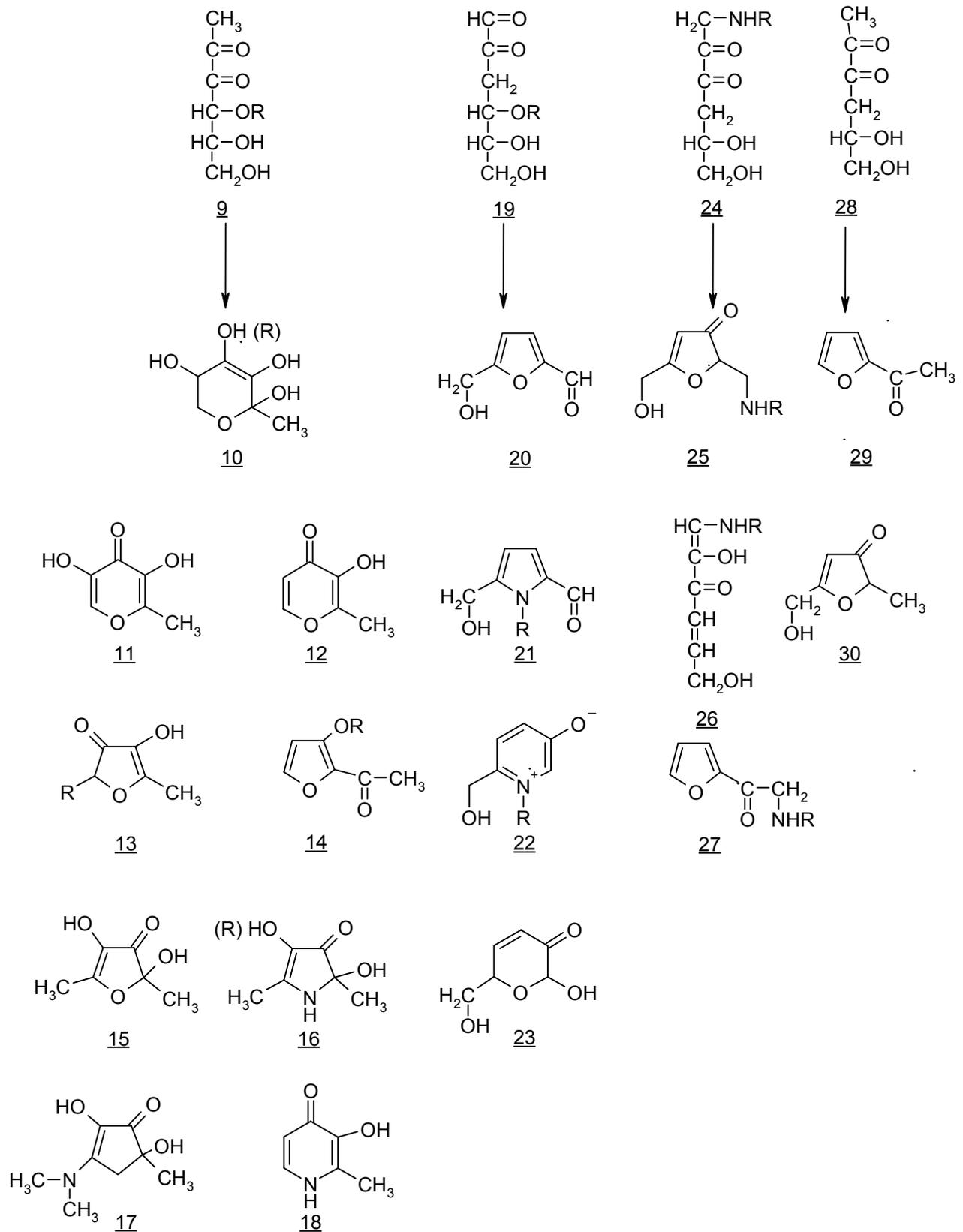


Abb. 15 Typische Folgeprodukten der Desoxyhexosulosen

In Gegenwart von sekundären Aminen reagiert Acetylformoin 15 weiter zu Aminohexosereduktonen vom Typ 17 (Weygand et al., 1958). Unter optimalen Bedingungen können solche Aminohexosereduktone in relativ hohen Ausbeuten (bezüglich des Zuckers) isoliert werden, da sie wesentlich stabiler sind als Acetylformoin. Die hohen Ausbeuten des stabileren 17 deuten also auf die Bedeutung von Acetylformoin hin, das wahrscheinlich nur auf Grund seiner hohen Reaktivität lediglich in kleinen Mengen nachgewiesen werden kann.

Aus Umsetzungen mit Disacchariden und primären, aliphatischen Aminen war das Pyridon 18 nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln das Hauptumsetzungsprodukt.

Neben der Cyclisierung und Eliminierung von Wasser verläuft der Abbau der 1-Desoxyhexosulose auch über die Fragmentierung zu Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion (s. 1.1.4.).

Wie schon unter 1.1.3. (Caramelisierung) berichtet, entsteht aus 3-Desoxyhexosulose 19 durch Ringschluss zwischen C2 und C5 sowie Wasserabspaltung das HMF 20. In Gegenwart höherer Konzentrationen primärer Amine erhält man statt des HMF das analoge Pyrolinon 21 (Jurc und Tatum, 1970). Da nur wenig Pyrolinon aus HMF und aliphatischen Aminen gebildet wird, entsteht (21) wohl bereits aus einer Vorstufe von HMF 20.

Ähnliches gilt für das Pyridiniumbetain 22. Es entsteht ebenfalls bei der Maillard-Reaktion von 3-Desoxyhexosulose in Gegenwart von aliphatischen Aminen, aber nicht aus aliphatischen Aminen und HMF.

Das β -Pyranon 23 besitzt in δ -Position ein durch die Carbonylgruppe über die Doppelbindung hinweg aktiviertes (acides) Proton, so dass C5 mit Aldehyden und Ketonen kondensieren und zu farbigen „Prämelanoidinen“ reagieren kann.

3-Desoxyhexosulose wurde auch in vivo detektiert, wo sie durch cross-linking an der Alterung von Proteinen beteiligt ist. Unter physiologischen Bedingungen ist sie z. B. in der Lage, Arginin und Lysin unter Bildung von Imidazolone zu verknüpfen (Konishi et al., 1994, Hayase et al., 1995).

Aus 1-Amino-1,4-Didesoxyhexosulose 24 entsteht durch Cyclisierung zwischen C2 und C5 das Furanon 25, das Westphal et al. (1981) massenspektrometrisch zuordneten.

Ein offenkettiges sechsgliedriges Aminoreduktion 26 konnten Estendorfer et al. (1990) erstmalig aus einem D-Glucose-Propylamin-Umsetzungsgemisch isolieren. Durch Ringschluss zwischen C3 und C6 der 1-Amino-1,4-didesoxyhexosulose und nach anschließender Dehydratisierung erhält man Aminoacetylfuran 27. Diese Furanstruktur tritt in besonders hohen Konzentrationen auf, wenn das Amadoriprodukt in Gegenwart von starken Säuren erhitzt wird.

In Analogie zu diesem Reaktionsmechanismus entsteht aus 1,4-Di-desoxyhexosulose 28 das Acetylfuran 29. Des Weiteren konnten Nedvidek et al. (1994) in Reaktionsgemischen aus D-Glucose und α -Aminosäuren das Furanon 30 nachweisen, das sie auf eine Reaktion von 1,4-Didesoxyhexosulose zurückführten.

Die hier aufgezählten heterocyclischen Verbindungen sind nur Beispiele für eine Vielzahl flüchtiger niedermolekularer Reaktionsprodukte der Desoxyhexosulosen. Auch aus Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur können Heterocyclen gebildet werden. Sie haben großen Anteil an der Bildung von sehr aromaaktiven Pyrazinen (Weenen et al., 1993, Cämmerer et al., 1999).

Darüber hinaus sollten α -Dicarbonylverbindungen auch zu einem hochmolekularen Grundgerüst kondensieren können (Abb. 16, Cämmerer und Kroh, 1995), an das weitere reaktive Substanzen gebunden werden.

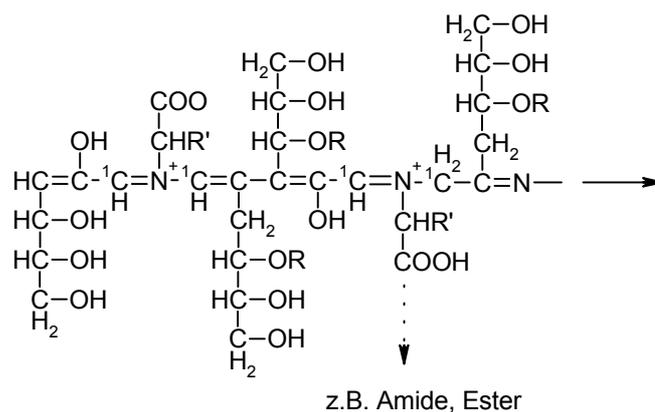


Abb. 16 Struktur des Melanoidins nach Cämmerer und Kroh (1995) R= H oder Kohlenhydrat, R' = Seitenkette von Aminosäuren

Z. B. können Chromophore, die bei der Reaktion von Zuckerfragmenten wie Glyoxal entstehen, in das Melanoidin eingebunden werden (Hofmann, 1998, Hofmann und Heuberger, 1999).

In physiologischen Systemen sind diese Zuckerfragmente in der Lage, Proteine durch „cross-links“ zu vernetzen (Glomb und Nagaraj, 1998).

Somit nehmen die α -Dicarbonyle sowohl bei der Bildung von Aroma als auch bei der Entstehung von Farbstoffen und der Alterung von Proteinen eine Schlüsselrolle ein.

1.2 Analytik der α -Dicarbonyle, Evaluation der verschiedenen Abfangmethoden und Reagenzien

α -Dicarbonyle können durch eine Reaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) oder Aminoguanidin in aromatische Chinoxalin- oder Triazinderivate überführt werden. Morita et al. (1981, 1985), Beck et al. (1988), Nedvidek et al. (1992), Feather et al. (1996) Hofmann et al. (1999) und andere haben eine Reaktion mit OPD oder Aminoguanidin als Abfangmethode qualitativ und auch quantitativ erfolgreich angewendet.

Die gebildeten Chinoxaline bzw. Triazine können Aufschluss über das Spektrum der intermediär gebildeten α -Dicarbonylverbindungen sowie das Ausmaß ihrer Bildung geben.

Beide Reaktionen beruhen auf einer Kondensation zwischen Amino- bzw. Hydrazingruppen und Carbonylgruppen zum Imin. Der aromatische Charakter der Reaktionsprodukte kann bei der Detektion (z. B. UV, Fluoreszenz, PND) genutzt werden.

Die Reaktion von OPD mit einem α -Dicarbonyl ergibt auf Grund der Symmetrie des Abfangreagenz' genau ein Reaktionsprodukt (Abb. 17).

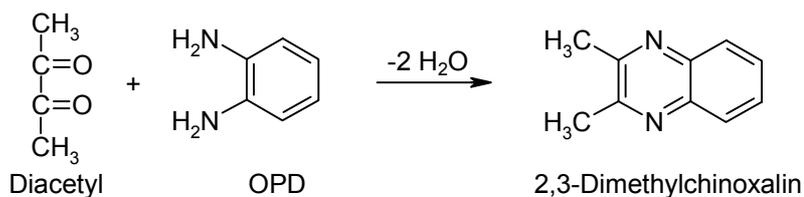


Abb. 17 Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) am Beispiel von Diacetyl

Im Unterschied dazu besitzt Aminoguanidin drei verschiedene Stickstoffsubstituenten. Die Hydrazingruppe wird zunächst mit einer der beiden Carbonylgruppen reagieren. Nachfolgend reagiert die Imingruppe mit der zweiten Carbonylgruppe zum Triazinring (Abb. 18). Falls nun das α -Dicarbonyl nicht symmetrisch substituiert ist, ergeben sich für das Triazin zwei an C5 und C6 unterschiedlich substituierte Isomere (Hirsch und Feather, 1994).

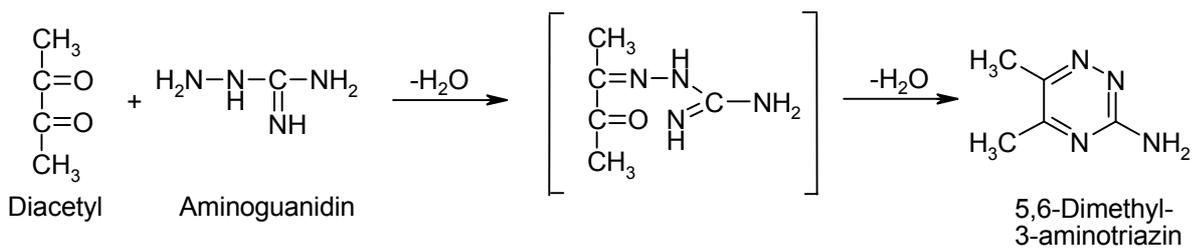


Abb. 18 Abfangreaktion mit Aminoguanidin am Beispiel von Diacetyl (Hirsch und Feather, 1994)

Bisher wurden Modellreaktionen zur Untersuchung der Bildung von α -Dicarbonylen in wässriger Lösung durchgeführt, wobei der pH-Wert meistens mit einem Puffersystem kontrolliert wurde (Beck et al. 1988, Nedvidek et al., 1994, Feather, 1996). Die gebildeten stabilen Chinoxaline bzw. Triazine wurden dann nach entsprechender Aufarbeitung entweder gaschromatografisch oder mittels HPLC durch Referenzsubstanzen zugeordnet und quantifiziert.

Zur möglichst vollständigen quantitativen Erfassung der α -Dicarbonyle wird das Abfangreagenz bereits vor der Reaktion dem Gemisch zugesetzt, so dass über den gesamten Reaktionszeitraum hinweg alle entstandenen α -Dicarbonyle zu stabilen Intermediaten abreagieren können. In Gegenwart des Abfangreagenz' wird die Summe des bisher gebildeten α -Dicarbonyls erhalten, da seine Abreaktion in situ unterbunden wird. Dieser experimentelle Aufbau führt zu relativ hohen Ausbeuten, birgt aber den Nachteil, dass die aminhaltigen Abfangreagenzien die Maillard-Reaktion oder Caramelisierung unzulässig stark beeinflussen könnten.

Eine Alternative dazu besteht im Zusatz des Abfangreagenz' erst nach der thermischen Behandlung des Reaktionsgemisches zuzusetzen (Hofmann et al., 1999). Damit minimieren die Autoren den Einfluss des Abfangreagenz'. Allerdings

sind auch die erzielten Ausbeuten an α -Dicarbonylen wesentlich geringer und die unterschiedliche Reaktivität der α -Dicarbonyle wirkt sich wahrscheinlich stärker auf die Aussagekraft des Ergebnisses aus. Ein unbestreitbarer Vorteil dieser Methode ist, dass die aktuelle Konzentration der reaktiven Verbindungen im Reaktionsgemisch gemessen werden kann.

Statt die α -Dicarbonyle abzufangen, kann man sie auch durch Reduktion in die weniger reaktiven Alkohole überführen und nach Derivatisierung gaschromatografisch quantifizieren (Knecht et al., 1992). Auch diese Methode erfasst nur die aktuelle Konzentration der α -Dicarbonyle. Außerdem muss ausgeschlossen sein, dass durch andere Desoxyzucker und Kohlenhydratderivate, die auch reduziert werden könnten, ein Überbefund verursacht wird.

1.3 Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Bildung der α -Dicarbonyle

Bei der Caramelisierung und Maillard-Reaktion geht eine hohe Konzentration von α -Dicarbonyle mit einer starken Bräunung einher.

Wichtige Reaktionsparameter bei der Caramelisierung sowie der Maillard-Reaktion sind die Temperatur, der Wassergehalt und der pH-Wert des Reaktionsgemisches.

Wie für alle chemischen Reaktionen gilt auch für die nichtenzymatische Bräunung, dass die Reaktion bei erhöhter Temperatur schneller verläuft. Die Maillard-Reaktion geht sowohl unter physiologischen Bedingungen vonstatten (Monnier und Sell, 1994), als auch bei Brat- und Röstprozessen (180-300 °C), wo sie wesentlich für die Bildung von Aromastoffen und Pigmenten ist. Für die Caramelisierung im quasi wasserfreien Milieu ist es nötig, dass der verwendete Zucker schmilzt (90-200 °C). In wässriger Lösung konnten aber auch schon bei 120 °C typische, heterocyclische Reaktionsprodukte der Caramelisierung nachgewiesen werden (Ito, 1977).

Die Wasseraktivität beeinflusst die Geschwindigkeit der nichtenzymatischen Bräunung auf verschiedene Weise. Da Wasser ein Reaktionsprodukt der Kondensation von Zucker und Amin ist, wird bei einer hohen Wasseraktivität die Gleichgewichtsreaktion der Kondensation zugunsten der Rückreaktion

verschoben. Das gilt auch für alle Dehydratisierungen, die im weiteren Verlauf von Maillard-Reaktion und Caramelisierung stattfinden (Eichner und Karel, 1972).

Ein höherer Wassergehalt wirkt sich außerdem auf die Konzentration der Reaktanten aus. Je verdünnter die Reaktionspartner vorliegen, um so langsamer sollte eine Reaktion ablaufen.

Einen gegenläufigen Effekt kann die Verringerung der Viskosität durch Verdünnung der Reaktionsgemische haben. Eine erniedrigte Viskosität hat eine erhöhte Mobilität der gelösten Stoffe zur Folge. Allerdings ist dieser Effekt bei hoher Wasseraktivität, verglichen mit den beiden erstgenannten Faktoren, relativ gering (Labuza und Saltmarch, 1981). Die Autoren geben als optimale Wasseraktivität für die nichtenzymatische Bräunung eine Wasseraktivität von 0,65-0,7 an, wobei der Einfluss von gelösten Substanzen und Feuchthaltemitteln beachtet werden muss. So fanden Eichner und Karel (1972) sowohl für flüssige als auch feste Modellsysteme, die Glycerol enthalten, eine optimale Wasseraktivität von 0,41-0,55. In diesem Fall fungiert Glycerol auch als Lösungsmittel und erlaubt den Molekülen so eine erhöhte Mobilität. Der Zusatz von Wasser verringert dann wieder die Geschwindigkeit der Kondensationsreaktionen in der nichtenzymatischen Bräunung. Feuchthaltemittel können damit also eine Verschiebung der optimalen Wasseraktivität in niedrigere Bereiche bewirken.

Der pH-Wert eines Reaktionsgemisches hat nicht nur einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der nichtenzymatischen Bräunung, sondern auch auf die ablaufenden Reaktionsmechanismen. Die Konzentration der Protonen nimmt während der Caramelisierung und der Maillard-Reaktion des Reaktionsgemisches durch die Bildung von organischen Säuren und CO₂ kontinuierlich zu.

In der Anfangsphase der Maillard-Reaktion wirkt sich ein hoher pH-Wert beschleunigend aus, da die Aminogruppen der Aminosäure dann deprotoniert und somit reaktiver vorliegen. Die nachfolgende Amadori-Umwandlung ist allerdings säure- und basenkatalysiert (Westphal und Kroh, 1985b). Mit höherem pH-Wert nimmt auch die Mutarotation der Zucker im Reaktionsgemisch zu und es liegt mehr Zucker in offenkettiger Form vor, was ebenfalls eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit zur Folge hat (Buera et al., 1887a). In alkalischen Lösungen kommt es zur Fragmentierung der Kohlenhydrate durch Retro-

Aldolreaktion. Dabei entstehen kleine sehr reaktive Zuckerfragmente, die zu einer schnellen Bräunung beitragen (Hayashi und Namiki, 1986, Weenen, 1998, Cämmerer et al., 1999). Für die Caramelisierung gilt das Gleiche. Im schwach sauren Reaktionsmilieu reagieren Kohlenhydrate nur sehr langsam.

Für das Reaktionsverhalten von poly- und oligomeren Sacchariden ist allerdings auch von Bedeutung, dass ein saurer pH-Wert zur Hydrolyse der glycosidischen Bindung führt, wodurch eine Aktivierung in der nichtenzymatischen Bräunung bewirkt (Buera et al., 1987b) wird.

Das Amadoriprodukt wird in Abhängigkeit vom pH-Wert über unterschiedliche Reaktionsmechanismen abgebaut. Bei saurem pH-Wert kommt es verstärkt zur Bildung des 1,2-Enaminol, so dass die 3-Desoxyhexosulose und ihre Folgeprodukte entstehen. Bei neutralem bis schwach alkalischem pH-Wert hingegen verläuft die Enolisierung vermehrt in Richtung des 2,3-Endiols, so dass die 1-Desoxyhexosulose und ihre Folgeprodukte dominieren (Hodge, 1967, Nedvidek, 1992a).

Für die Bräunung einer gepufferten wässrigen Lösung von Fructosylalanin fanden Pokorny et al. (1988) einen optimalen pH- Bereich von 8 bis 9.

2 Problemstellung und Ziele

Wie schon einleitend skizziert, hat die nichtenzymatische Bräunung einen großen Stellenwert bei der Erhitzung und Lagerung von Lebensmitteln.

Durch Caramelisierung und Maillard-Reaktion entstehen dabei eine Vielzahl von niedrig- und hochmolekularen Stoffen, die aus zahlreichen, z. T. sehr komplexen Reaktionen hervorgehen.

Seit der erstmaligen Beschreibung der Reaktion zwischen Aminosäuren und Zuckern wurde immer wieder versucht, die Reaktionsmechanismen während der Maillard-Reaktion zu strukturieren und wichtige Intermediate zu identifizieren (Hodge, 1953, Ledl und Schleicher, 1990). So beschrieben in den letzten Jahren verschiedene Autoren die besondere Rolle der α -Dicarbonyle innerhalb von Maillard-Reaktion und Caramelisierung vorwiegend von Monosacchariden (Beck et al. (1988), Nedvidek (1992 a,b), Feather et al. (1996), Hofmann et al. (1999)).

Das Ziel dieser Arbeit besteht in einer systematischen Untersuchung der Bildung von hochreaktiven Schlüsselintermediaten wie z. B. α -Dicarbonylen in den verschiedenen Caramelisierungs- und Maillard-Reaktionsmodellen. Es wird angestrebt, aus den gewonnenen Daten vergleichende Rückschlüsse auf Reaktionsmechanismen bei der nichtenzymatischen Bräunung von Mono- und Oligosacchariden zu ziehen. Der Vergleich des Reaktionsverhaltens von Mono- und Oligosacchariden soll Besonderheiten in der Reaktion der Oligomeren aufzeigen.

Um zwischen Caramelisierung und Maillard-Reaktion differenzieren zu können, werden die Proben in Abwesenheit und Gegenwart von Glycin thermolysiert. Das Abfangreagenz OPD wird bereits vor der Thermolyse zugesetzt, um so über den ganzen Reaktionszeitraum die Gesamtheit der gebildeten α -Dicarbonyle zu erfassen.

Zunächst ist es nötig zu überprüfen, ob OPD als Abfangreagenz in Maillard-Reaktionsgemischen mit Kohlenhydrat und Aminosäure geeignet ist.

In Thermolysen von Reaktionsgemischen, die D-Glucose oder Maltose enthalten, wird nun mit Hilfe von OPD die Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur untersucht. Im Vergleich dazu sollen die korrespondierenden

Ketosen D-Fructose und Maltulose mit in die Untersuchungen einbezogen werden. Diese Thermolysen werden ebenfalls nach dem Zusatz von Glycin durchgeführt, um Unterschiede zwischen den Produktspektren von Maillard-Reaktion und Caramelisierung feststellen zu können.

Die Untersuchung der Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur bzw. der Chinoxaline erfolgt mittels GC/FID und GC/MS.

Die meisten Lebensmittel enthalten allerdings Kohlenhydrate in polymerer Form. Es wird daher untersucht, wie sich der Polymerisierungsgrad auf die Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur und auf Desoxyhexosulosen und somit auf die nichtenzymatische Bräunung auswirkt.

Zur Analytik der α -Dicarbonyle und im Besonderen der Desoxyhexosulosen in Reaktionsgemischen von D-Glucose, Maltose, Maltotriose soll eine HPLC-Methode entwickelt werden, so dass weder eine Extraktion noch eine weitere Derivatisierung der Chinoxaline für die gaschromatografische Analytik notwendig ist. Des Weiteren sind die entsprechenden Referenzsubstanzen für die Chinoxaline der Desoxyhexosulosen zu synthetisieren und strukturell abzusichern.

Die Umsetzungen mit quasi-wasserfreien Ausgangsstoffen dienen als Modell für Prozesse, die beim Braten und Backen an der Oberfläche auftreten.

Es werden Reaktionsgemische von D-Glucose, Maltose, Maltotriose in Anwesenheit von OPD untersucht. Unter Maillard-Reaktionsbedingungen enthalten die Gemische zusätzlich Glycin.

Zur umfassenden Charakterisierung der untersuchten Reaktionsmodelle sollen neben der Quantifizierung von α -Dicarbonylen auch die Abnahme der Menge an eingesetzten Kohlenhydraten, die Bildung von Isomerisierungs- und gegebenenfalls Amadoriprodukten sowie die Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad verfolgt werden.

Außerdem wird erwartet, dass der Vergleich von Umsetzungen des reinen Amadoriproduktes mit Thermolysen von entsprechenden Maillard-Reaktionsgemischen Aufschluss über die Rolle des Amadoriproduktes bezüglich der Bildung von α -Dicarbonylen in der Maillard-Reaktion gibt.

In der Lebensmittelchemie ist es wichtig, die komplexen Vorgänge der Caramelisierung und Maillard-Reaktion möglichst im Detail zu verstehen, um das Produktspektrum der nichtenzymatischen Bräunung durch geschickte Wahl der Reaktanten und Reaktionsbedingungen beeinflussen zu können. Daher wird nicht nur die Zusammensetzung, sondern auch der Wassergehalt bei den oben genannten Experimenten variiert.

In 0,25 M Lösungen der im oberen Abschnitt genannten Ausgangsstoffe wird modellhaft versucht, das Spektrum der entstehenden α -Dicarbone und anderer Analyten während des Sterilisierens, Pasteurisierens oder Kochens von Lebensmitteln zu untersuchen.

In den Caramelisierungs- und Maillard-Reaktionsmodellen werden wie unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen die entstandenen α -Dicarbone, die Abnahme der eingesetzten Kohlenhydrate, die Bildung von Isomerisierungs- und Amadoriprodukten sowie die Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad quantifiziert.

In wässriger Lösung soll die analoge Umsetzung mit reinem Amadoriprodukt Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss die Reaktionsbedingungen auf dessen Rolle bei der Bildung von α -Dicarbone haben.

Untersuchungsergebnisse von Dextrin 10 in wässrigen Caramelisierungs- und Maillard-Reaktionsmodellen sollen mit den Trends und Aussagen über den Einfluss des Polymerisierungsgrades in wässriger Lösung verglichen werden.

Für die Bestimmung der Kohlenhydrate und der Amadoriprodukte wird vorwiegend die HPTLC eingesetzt, da sie einen schnellen und genauen Nachweis der einzelnen Substanzen ermöglicht.

Aus den erhaltenen Ergebnissen sollen Schlussfolgerungen über die Besonderheiten der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden, aber auch über deren Gemeinsamkeiten mit Monosacchariden abgeleitet werden. Es wird erwartet, dass Reaktionswege von Oligosacchariden innerhalb der Maillard-Reaktion aufgeklärt und mit denen der Monosaccharide verglichen werden können. Gleichzeitig wird der Einfluss des Wassergehaltes auf die Bildung der genannten Analyte untersucht.

Diese Untersuchungen sollen einen Einblick in die frühe und fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden ermöglichen.

3 Quantifizierung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur während der nichtenzymatischen Bräunung von Mono- und Disacchariden

3.1 Evaluation von o-Phenylendiamin (OPD) als Abfangreagenz in der Maillard-Reaktion

Ledl und Schleicher (1990) vertraten erstmalig die Auffassung, dass die Hexosulosen und Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur Schlüsselintermediate bei der nichtenzymatischen Bräunung sind. Zur Untersuchung dieser reaktiven Intermediate benutzten die Autoren ortho-Phenylendiamin (OPD). Diese Verbindung reagiert mit α -Dicarbonylen zu reaktiv stabilen Chinoxalinen und sollte sich somit hemmend auf den Fortgang der nichtenzymatischen Bräunung auswirken.

Um die Wirksamkeit von OPD als Abfangreagenz zu überprüfen, wird die Maillard-Reaktion zwischen D-Glucose und Glycin in wässriger gepufferter Lösung (0,1 M) in Abwesenheit und Anwesenheit von OPD durchgeführt (Abb. 19). Die Reaktion findet bei 100 °C statt (Kochen am Rückfluss).

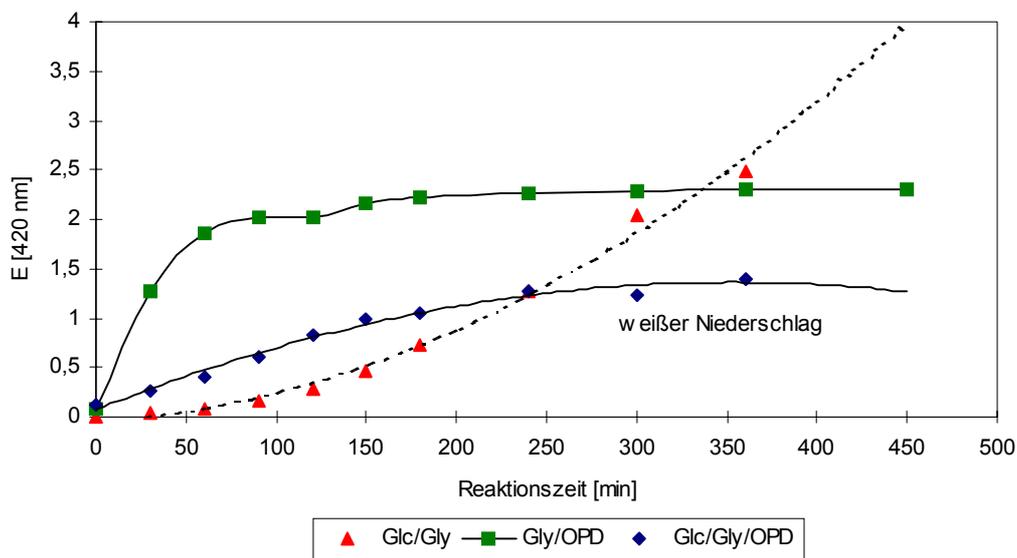


Abb. 19 Bräunung von D-Glucose/Glycin/OPD (Glc/Gly/OPD) Glycin/OPD (Gly/OPD) und D-Glucose/Glycin (Glc/Gly)

Zusätzlich soll ein Experiment mit einer 0,1 M Lösung von Glycin und OPD unter gleichen Reaktionsbedingungen zeigen, inwieweit die Farbbildung durch die Aminkomponenten allein zustande kommt.

In Abb. 18 sieht man, dass die Absorption ($\lambda = 420 \text{ nm}$) für das Gemisch D-Glucose/Glycin wie erwartet nach einer Induktionsphase von ca. 60 min exponentiell ansteigt. Mit zunehmender Reaktionszeit färbt sich die Lösung tief braun. Auch bei der Umsetzung von Glycin/OPD ohne die Kohlenhydratkomponente ist eine deutliche Zunahme der Absorption zu verzeichnen. Allerdings beobachtet man hier schon nach 90 min eine starke Gelbfärbung des Reaktionsgemisches, die im weiteren Verlauf der Reaktion nicht mehr wesentlich zunimmt und sich deutlich von dem typischen Brauntönen der Melanoidine unterscheidet.

Bei der Thermolyse von D-Glucose und Glycin in Gegenwart von OPD ist in der frühen Phase der Reaktion eine stärkere Färbung des Reaktionsgemisches als in Abwesenheit der Abfangreagenz zu beobachten. Wie aus den Vorversuchen abzuleiten ist, wird wahrscheinlich die Zunahme der Absorption durch die Reaktion Glycin/OPD hervorgerufen, während sich die Reaktion von D-Glucose und Glycin noch in der Induktionsphase befindet. Im weiteren Verlauf der Reaktion erkennt man allerdings deutlich, dass OPD die Bildung von Melanoidinen hemmt. Insgesamt ist die Bräunung im Gemisch D-Glucose/Glycin/OPD stark verzögert. Sie bleibt auch hinter der Pigmentbildung aus Glycin/OPD zurück, da durch das Abfangen der reaktiven α -Dicarbonyle und durch die Bildung von Chinoxalinen OPD verbraucht wird. Diese Interpretation der Ergebnisse wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass sich ein weißer Niederschlag im Gemisch D-Glucose/Glycin/OPD ausbildet. Es könnte sich hierbei um gebildete Chinoxaline handeln, die relativ schlecht wasserlöslich sind.

Eine weitere Möglichkeit, den Effekt von OPD auf die nichtenzymatische Bräunung zu untersuchen, ist der Einsatz von OPD in unterschiedlichen Konzentrationen im Reaktionsgemisch. Da OPD selbst zwei Aminfunktionen besitzt, könnte es ebenfalls im Sinne der Maillard-Reaktion mit D-Glucose reagieren. Allerdings wirkt sich die Aromatizität des Benzylringes deaktivierend auf die Amingruppen aus. Sollte eine erhöhte Konzentration von OPD eine starke Zunahme der Chinoxalkonzentration hervorrufen, würde das heißen, dass OPD selbst im Sinne der Maillard-Reaktion reagiert und dass dadurch die Mechanismen der zu untersuchenden Reaktionsmodelle unzulässig stark beeinflusst würden.

D-Glucose (Glc) wird im äquimolaren Verhältnis mit OPD gemischt und unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen thermolysiert (Glc/OPD). Das gleiche Experiment wurde dann mit der doppelten Menge OPD (Glc/2OPD) und mit äquimolaren Mengen an Glycin (Gly) und OPD (Glc/Gly/OPD) durchgeführt. In diesen Reaktionsgemischen lassen sich die Chinoxaline von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion anhand eines internen Standards gaschromatografisch quantifizieren. Die Ausbeuten an Chinoxalinen und somit an α -Dicarbonylen werden in mol% -bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge an Kohlenhydrat- angegeben.

Abb. 20 fasst noch einmal die möglichen Reaktionswege und die aus ihnen resultierenden Fragmente mit α -Dicarbonylstruktur zusammen.

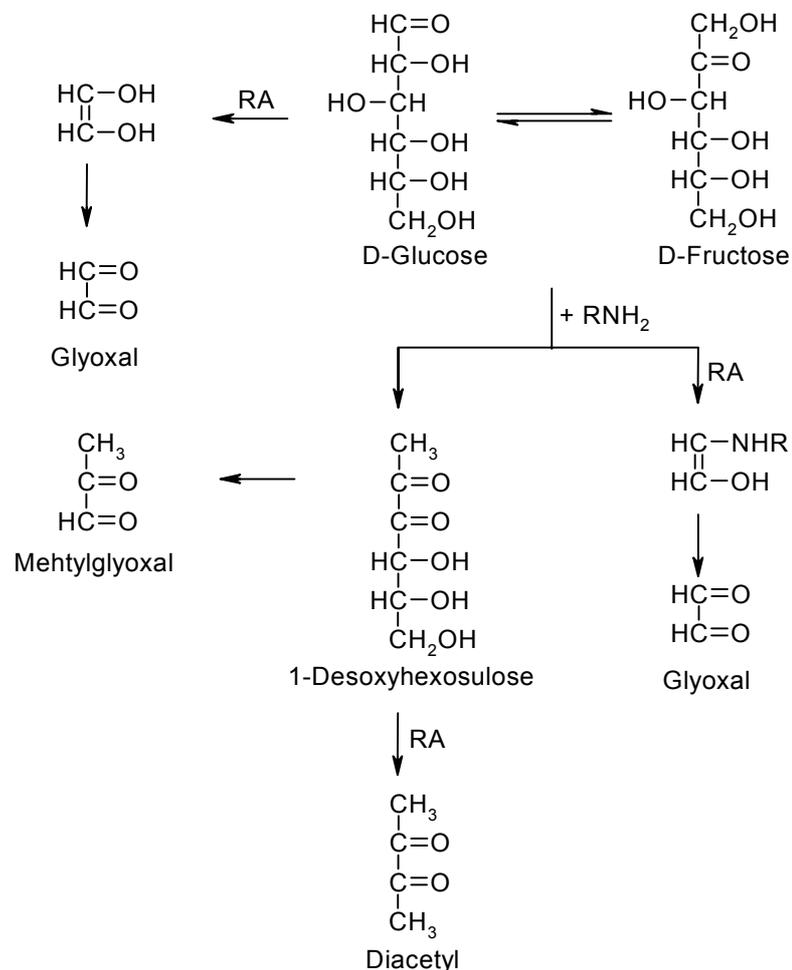


Abb. 20 Schema der Fragmentation von D-Glucose und D-Fructose während der nichtenzymatischen Bräunung

Auf die Bildung von *Methylglyoxal* wirkt sich der 100 %ige Überschuss an OPD im Reaktionsgemisch Glc/2OPD nur unmaßgeblich aus. Die Konzentration des Spaltungsproduktes erhöht sich lediglich um ca. 15 % bei Verdopplung der Konzentration des Abfangreagenz'.

Im Gegensatz dazu verursacht der Zusatz der Aminosäure Glycin im äquimolaren Gemisch D-Glucose/Glycin/OPD einen sehr starken Anstieg der Methylglyoxal-konzentration auf ca. das Dreifache (Abb. 21).

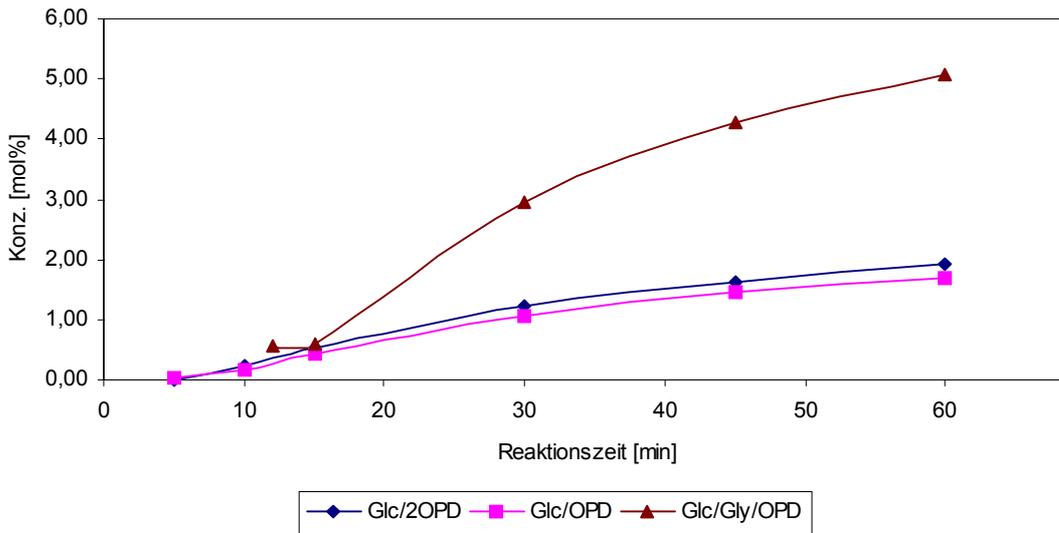


Abb. 21 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

Auch die Entstehung von *Diacetyl* wird hauptsächlich durch den Zusatz von Glycin beeinflusst (Abb. 22). Der Anstieg der Konzentration bei der Reaktion Glc/Gly/OPD ist hier noch deutlicher. In Anwesenheit von Glycin detektiert man ca. viermal mehr Diacetyl als in Abwesenheit der Aminosäure. Die Erhöhung der Konzentration von OPD hingegen hat einen vernachlässigbaren Effekt.

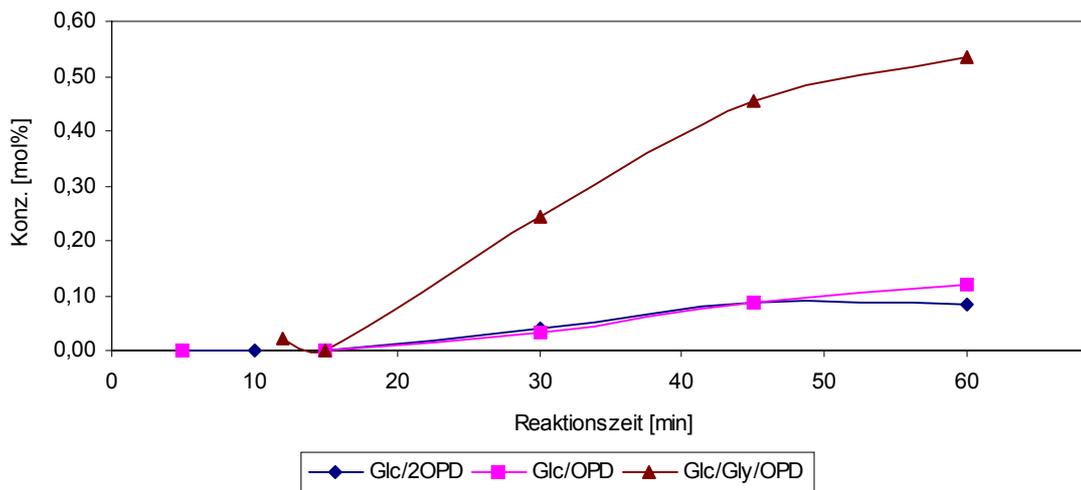


Abb. 22 Bildung von Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

Für *Glyoxal* ist fast eine Verdopplung der gebildeten Konzentration bei der Reaktion von D-Glucose mit einem Überschuss an OPD (Glc/2OPD) im Vergleich zum äquimolaren Reaktionsgemisch (Glc/OPD) zu verzeichnen (Abb. 23). Der Zusatz von Glycin bewirkt nur eine geringfügige Erhöhung der Glyoxalkonzentration, die sogar unter der von Glc/2OPD bleibt. Unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen wird relativ wenig Glyoxal gebildet, und es scheint unter diesen Reaktionsbedingungen ein weniger wichtiges Intermediat der nichtenzymatischen Bräunung zu sein. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass Glyoxal in diesem Fall eher durch Oxidation und Fragmentierung aus D-Glucose entsteht und dass das OPD an der Oxidationsreaktion teilnimmt. Auch in der Modellmischung für die Maillard-Reaktion (Glc/Gly/OPD) wurde nicht mehr Glyoxal gebildet als bei starkem OPD-Überschuss.

Hayashi et al. (1985) und Hofmann et al. (1999) haben Mechanismen für die Fragmentierung von Zuckern vorgeschlagen, die einen Oxidationsschritt beinhalten. Auf diese Reaktionen wird in 3.2. genauer eingegangen.

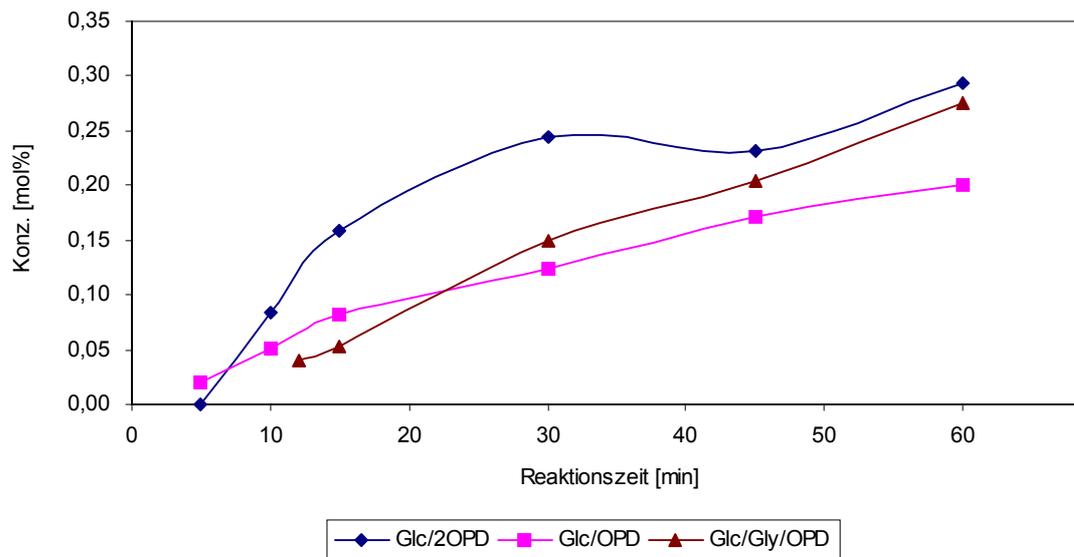


Abb. 23 Bildung von Glyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

OPD ist also durchaus zur Untersuchung der α -Dicarbonyle innerhalb der nichtenzymatischen Bräunung als Abfangreagenz geeignet. Allerdings muss man sich des Modellcharakters der im folgenden untersuchten Reaktionen bewusst sein, so könnte auch die Bildung der Chinoxaline das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der α -Dicarbonyle verschieben. Die Modellreaktionen spiegeln nicht in allen Aspekten die Realität wider, können aber wichtige Beiträge zur weiteren Aufklärung des Spektrums der verschiedenen gebildeten α -Dicarbonyle leisten und quantitative Aussagen im Rahmen von Trends liefern.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist kein Verfahren bekannt, α -Dicarbonyle in Maillard-Reaktionsgemischen zu analysieren, ohne dabei die genannten Fehlerquellen in Kauf zu nehmen. Aus diesem Grund werden die vorliegenden Ergebnisse ausschließlich im Zusammenhang betrachtet und nur Aussagen zu relativen Veränderungen getroffen.

3.2 Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur aus D-Glucose und D-Fructose

Die hohe Bräunungsaktivität von Zuckerfragmenten wurde schon von Hayashi und Namiki (1986b) sowie Hofmann (1999) beschrieben. Neben Substanzen mit α -Hydroxy-carbonylfunktionen weisen besonders Zuckerfragmente mit α -Di-

carbonylgruppen eine hohe Bräunungsaktivität auf. Diese Eigenschaft beruht zum einen auf ihrer Fähigkeit zur Vernetzung von bereits gebildeten „Prämelanoidinen“ (Cämmerer und Kroh, 1999), zum anderen können sie in der Reaktion mit Aminosäuren aber auch unterschiedlich substituierte Pyrazinradikale bilden. Für die oben genannten Autoren ist die Bildung dieser gefärbten Radikale besonders in der Anfangsphase der Bräunung von großer Wichtigkeit. Das Kapitel 1.1.4. beschäftigte sich bereits mit den verschiedenen Möglichkeiten zur Bildung von Zuckerfragmenten, die eine α -Dicarbonylstruktur besitzen.

Zur Untersuchung von Caramelisierung und Maillard-Reaktion im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu wird D-Glucose in Anwesenheit von OPD erhitzt und das Ausmaß der Fragmentierung bestimmt.

Glyoxal wird, wie schon unter 3.1. ausgeführt, im Modell für die Caramelisierung (Glc/OPD) nur zu einem sehr geringen Anteil gebildet. Nach 60 min sind nur 0,2 mol% (Ausbeute bezogen auf die Ausgangsstoffe) Glyoxal nachweisbar (Abb. 24). Der äquimolare Zusatz von Glycin (Glc/Gly/OPD) bewirkt nur eine geringe Steigerung der Glyoxalkonzentration und zwar auf 0,28 mol%. Dieser Effekt ist vergleichbar mit der Wirkung eines doppelten Zusatzes von OPD (Glc/2OPD). Demnach sollte Glyoxal unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen kein typisches Maillard-Reaktionsprodukt sein.

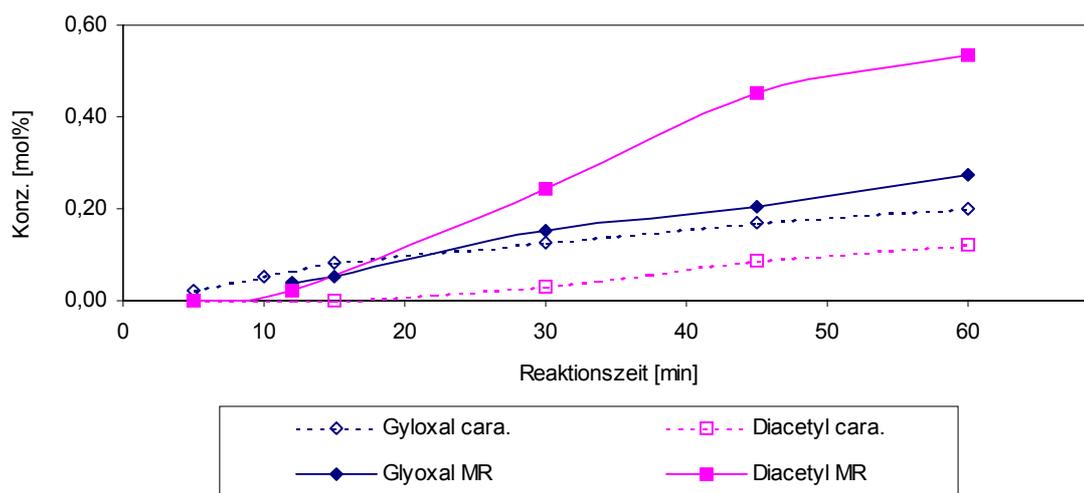


Abb. 24 Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol; 1 mmol; cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Eine basenkatalysierte Retro-Aldolreaktion könnte bei der Bildung von Glyoxal unter quasi wasserfreien Bedingungen den Hauptweg darstellen. Dabei spielt der Zusatz einer Aminosäure offensichtlich als basischer Katalysator im klassischen Sinne eine Rolle. Die Glyoxalbildung durch Retro-Aldolreaktion der Schiff'schen Base (Glucosylimin), wie von Namiki und Hayashi (1981) vorgeschlagen, ist wahrscheinlich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen von untergeordneter Bedeutung.

Bei der basenkatalysierten Spaltung der D-Glucose wird das Proton der Hydroxylgruppe am Kohlenstoff C3 durch die Aminogruppe oder das Carboxylion der Aminosäure abstrahiert und so eine Verschiebung der Elektronenpaare eingeleitet und durch Umwandlung der Carbonylgruppe in eine Alkoholatgruppe an C1 die Spaltung zwischen C2 und C3 abgeschlossen (Abb.08 in 1.1.4). Der Mechanismus wird in Anlehnung an Hayashi et al. (1985) postuliert, die allerdings die Schiff'sche Base als Ausgangsstoff annehmen.

Neben dem Vorhandensein einer Base könnte die Oxidation ein anderer limitierender Schritt innerhalb des skizzierten Reaktionsmechanismus' sein. Da die Reaktion in geschlossenen Ampullen durchgeführt wird, könnte die Glyoxalbildung auch durch die ungenügende Menge an Sauerstoff gehemmt sein.

Diacetyl wird verstärkt unter Maillard-Reaktionsbedingungen gebildet. Während es in Abwesenheit von Glycin nur zu 0,12 mol% enthalten ist, steigt seine Konzentration im Maillard-Reaktionsgemisch auf 0,53 mol% nach 60 min (Abb. 24). Zwar sind beide Ausbeuten verhältnismäßig klein, aber die starke Konzentrationsveränderung, die durch den Zusatz einer Aminosäure erreicht wird, ist bemerkenswert.

Die Bildung von Diacetyl läuft in der Maillard-Reaktion über Intermediate, die als Ausgangsstoffe für eine Spaltung des Hexosekörpers dienen können. Kim (1994) schlägt hierfür 1-Desoxyhexosulose als Precursor und die Retro-Aldolreaktion als Spaltmechanismus vor (s. auch 1.1.4.).

Methylglyoxal ist neben Glyoxal und Diacetyl ein weiteres Abbauprodukt der D-Glucose mit α -Dicarbonylfunktion. Es ist das Produkt einer Spaltung zwischen C3 und C4 der Hexose. Im Reaktionsgemisch der Caramelisierung wird es nach 60 min mit 1,7 mol% nachgewiesen (Abb. 25). Von den untersuchten Analyten (Glyoxal, Methylglyoxal, Diacetyl) entsteht es in der höchsten Konzentration.

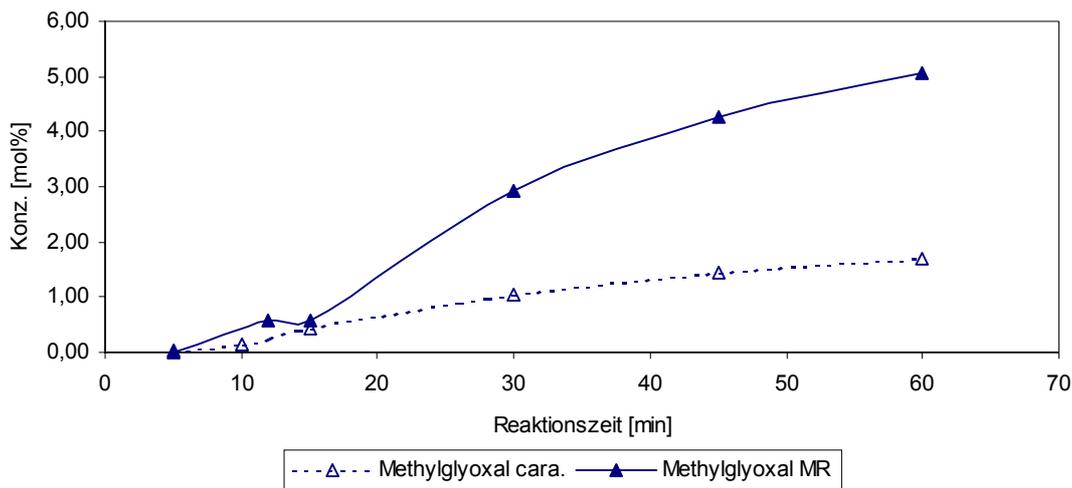


Abb. 25 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (MR)

Unter Caramelisierungsbedingungen (Glc/OPD) ist für die Bildung von Methylglyoxal eine Reaktion im Sinne der beschriebenen Retro-Aldolreaktion der D-Glucose möglich. Außerdem wird in der Literatur die Möglichkeit der Retro-Aldolreaktion von 1-Desoxyhexosulose für die Bildung von Methylglyoxal diskutiert (Kim, 1994). Jedoch ist die Bildung dieses Intermediats aus D-Glucose in Abwesenheit einer Aminosäure eher unwahrscheinlich (Ledl, 1987).

Im Maillard-Reaktionsgemisch (Glc/Gly/OPD) entsteht wesentlich mehr Methylglyoxal als bei der Caramelisierung (Glc/OPD). Am Ende der untersuchten Reaktionszeit beträgt seine Konzentration 5,07 mol% (Abb. 25). Dieser Effekt ist durch den doppelten Zusatz von OPD nicht zu erreichen (s. 3.1.), also wird Methylglyoxal verstärkt in der Reaktion zwischen D-Glucose und Glycin gebildet. Offensichtlich sind Maillard-Reaktionsprodukte die wichtigsten Precursoren für die Bildung dieses α -Dicarbonyls. Neben der schon erwähnten 1-Desoxyhexosulose können aber auch andere Intermediate der Maillard-Reaktion dafür geeignet. Bereits das 2,3-Endiol, eine Vorstufe der 1-Desoxyhexosulose, oder auch das Amadoriprodukt können Ausgangsstoffe für eine Retro-Aldolreaktion sein. Die anschließende β -Eliminierung führt dann zu Methylglyoxal (Hayashi et al., 1986).

Auch in Reaktionsgemischen mit D-Fructose (Fru) können die genannten Zuckerfragmente quantifiziert werden.

Auf die Bildung von *Glyoxal* aus D-Fruktose hat der Zusatz von Glycin (Fru/Gly/OPD) im Unterschied zur Bildung aus D-Glucose einen relativ starken Einfluss (Abb. 26).

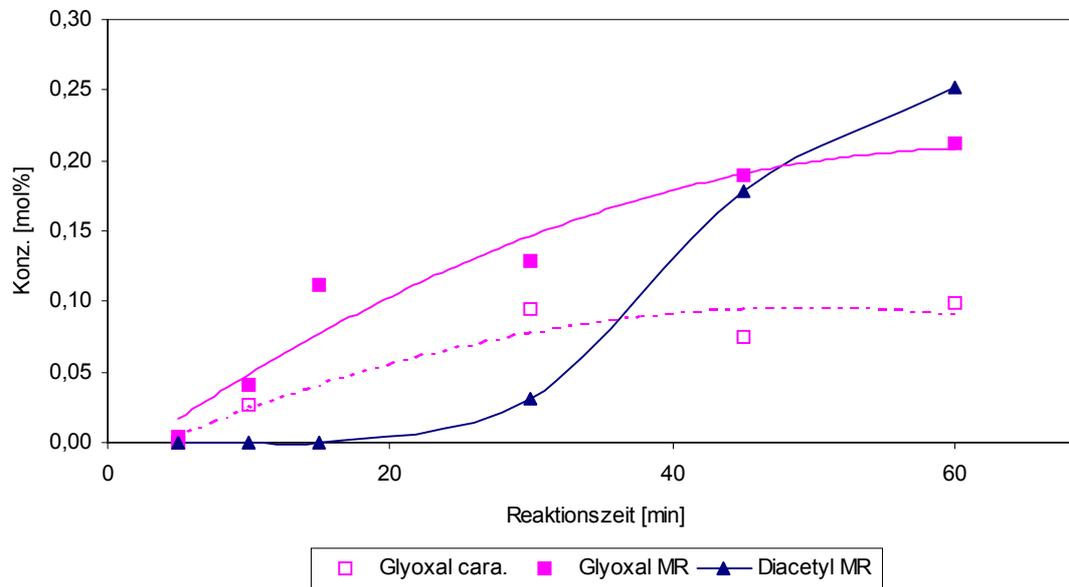


Abb. 26 Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fruktose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus D-Fruktose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Zwar wird sowohl in der Caramelisierung (Fru/OPD) als auch unter Maillard-Reaktionsbedingungen (Fru/Gly/OPD) sehr wenig Glyoxal als Chinoxalin detektiert, aber während in Abwesenheit von Glycin nur 0,1 mol% des α -Dicarbonyls innerhalb von 60 min gebildet wird, bewirkt der Zusatz der Aminosäure eine Verdopplung des gebildeten Glyoxals (0,21 mol%, Abb. 26).

Die größere Wirkung von Glycin auf die Bildung dieses α -Dicarbonyls aus der Ketose bei gleichzeitig geringerer Ausbeute (verglichen mit D-Glucose unter den gleichen Reaktionsbedingungen) könnte mit der Notwendigkeit zur Bildung des Heynsproduktes begründet werden. Denn erst das Glucosglycin mit der Carbonylgruppe an C1 kann durch Retro-Aldolreaktion zu Glyoxal reagieren.

Das Fehlen von *Diacetyl* im Caramelisierungsgemisch (Fru/OPD) unterstützt die Aussage, dass dieses Zuckerfragment unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur aus Intermediaten der Maillard-Reaktion gebildet werden kann. Der Zusatz von Glycin führt zur Bildung von 0,25 mol% Diacetyl nach 60 min (Abb. 26). Auch die lange Induktionsphase für die Diacetylbildung während der

Maillard-Reaktion spricht dafür, dass erst ein Intermediat der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion Ausgangsstoff für die Bildung von Diacetyl ist.

Auch *Methylglyoxal* wird aus D-Fructose in geringeren Mengen gebildet als aus D-Glucose. In Abwesenheit von Glycin (Fru/OPD) entsteht es zu 0,69 mol% (Abb. 27). Unter Maillard-Reaktionsbedingungen (Fru/Gly/OPD) wird mit 3,51 mol% vergleichsweise viel Methylglyoxal gebildet. Hier könnte schon die Schiff'sche Base ein guter Ausgangsstoff für die Retro-Aldolreaktion sein. Die anschließende vinyloge β -Eliminierung führt dann zur Bildung von Methylglyoxal.

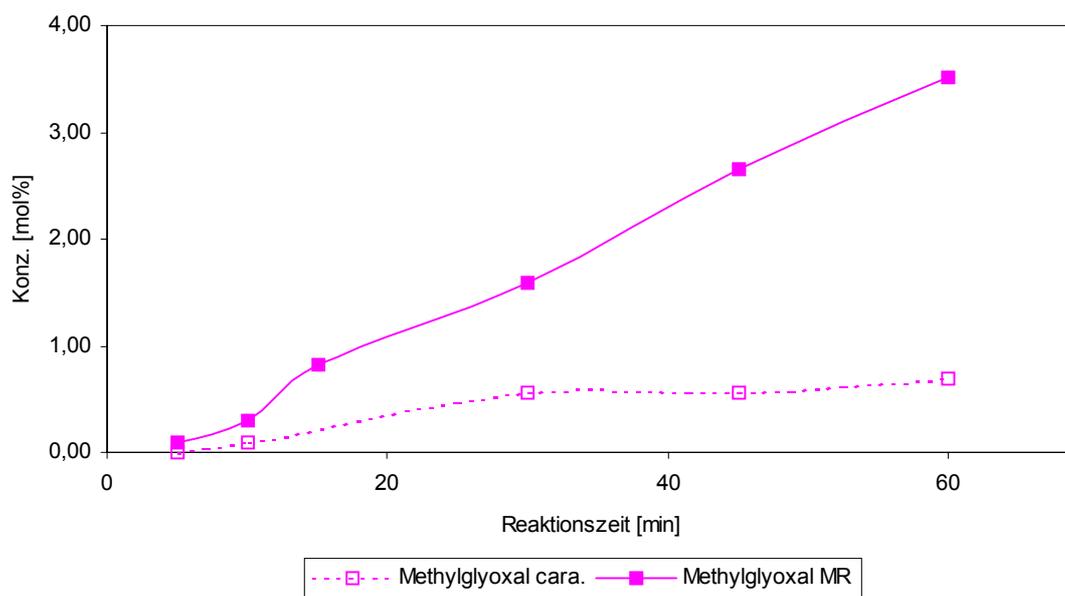


Abb. 27 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fructose/OPD (cara.) und aus D-Fructose/Glycin/OPD (MR)

Außer der Schiff'schen Base sollte auch die 1-Desoxyhexosulose ein möglicher Precursor für Methylglyoxal sein, da sie ebenfalls in der Literatur als Maillard-Reaktionsprodukt der D-Fructose beschrieben wird (Belitz und Grosch, 1992). Die geringere Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion aus D-Fructose (im Vergleich mit D-Glucose) könnte dadurch erklärt werden, dass sich aus der furanoiden Konformation der D-Fructose durch Dehydratisierung relativ leicht Furankörper bilden. Die von Ponder und Richards (1993) diskutierte erleichterte Bildung von HMF und anderen Furanderivaten aus der Furanoseform der D-Fructose könnte dann durch Kondensation der Heterocyclen zur verstärkten Ausbildung von Melanoidinen führen (Abb. 28).

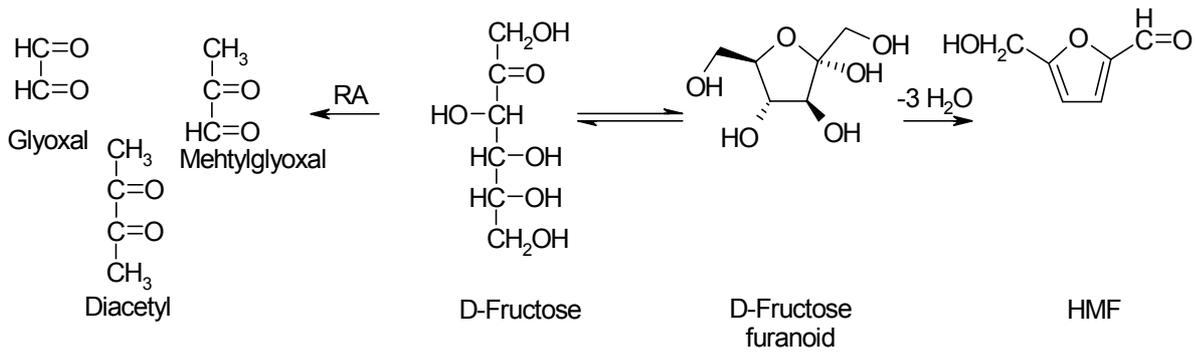


Abb. 28 Mögliche Reaktionswege der D-Fructose (schematisch)

Zwar liegt D-Fructose in wässriger Lösung zu einem höheren Anteil als D-Glucose in der offenkettigen Form vor, jedoch scheint sich die geringere Carbonylaktivität der Ketogruppe in der D-Fructose negativ auf die Bildung von Fragmenten auszuwirken.

3.3 α -Dicarbone aus Maltose und Maltulose

Da die meisten Lebensmittel nicht nur Monosaccharide, sondern hauptsächlich oligo- und polymere Kohlenhydrate enthalten, werden auch Disaccharide als einfachste Oligosaccharide hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion untersucht.

Wie erwartet, wird sowohl für Maltose (Mal) als auch für Maltulose (Mlt) eine längere Induktionszeit als für die nichtenzymatische Bräunung der entsprechenden Monosaccharide beobachtet. So wird z. B. im Reaktionsgemisch Maltose/Glycin/OPD nach 90 min eine Methylglyoxalkonzentration erreicht (Abb. 29), die bei D-Glucose/Glycin/OPD bereits nach 30 min erreicht ist. Insgesamt sind innerhalb der untersuchten Zeitspanne die Ausbeuten für die untersuchten Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur in den Reaktionsgemischen mit Disacchariden wesentlich geringer als in denen mit Monosacchariden.

Diacetyl wird unter Caramelisierungsbedingungen auch nach 90 min nicht aus Maltose (Mal/OPD) gebildet. *Methylglyoxal* (0,31 mol%) und *Glyoxal* (0,37 mol%) entstehen nur in geringen Mengen (Abb. 29).

Die Bildung von *Methylglyoxal* wird vor allem durch die Anwesenheit von Glycin im Reaktionsgemisch (Mal/Gly/OPD) verstärkt, nach 90 min sind 2,29 mol% Methylglyoxal im Reaktionsgemisch enthalten.

Die *Glyoxal-* und *Diacetyl*bildung wird dadurch jedoch nicht in gleichem Maße verstärkt (Abb. 29). Das C2-Fragment entsteht nach 90 min zu 0,50 mol% und Diacetyl wird zu 0,14 mol% gebildet. Der Einfluss von Glycin auf die Glyoxalbildung ist wahrscheinlich aus denselben Gründen wie beim Monosaccharid D-Glucose (s. 3.2.) relativ gering.

Wie schon erwähnt wird aus Maltose nur unter Maillard-Reaktionsbedingungen Diacetyl gebildet und auch dann nur in sehr geringen Mengen (Abb. 29).

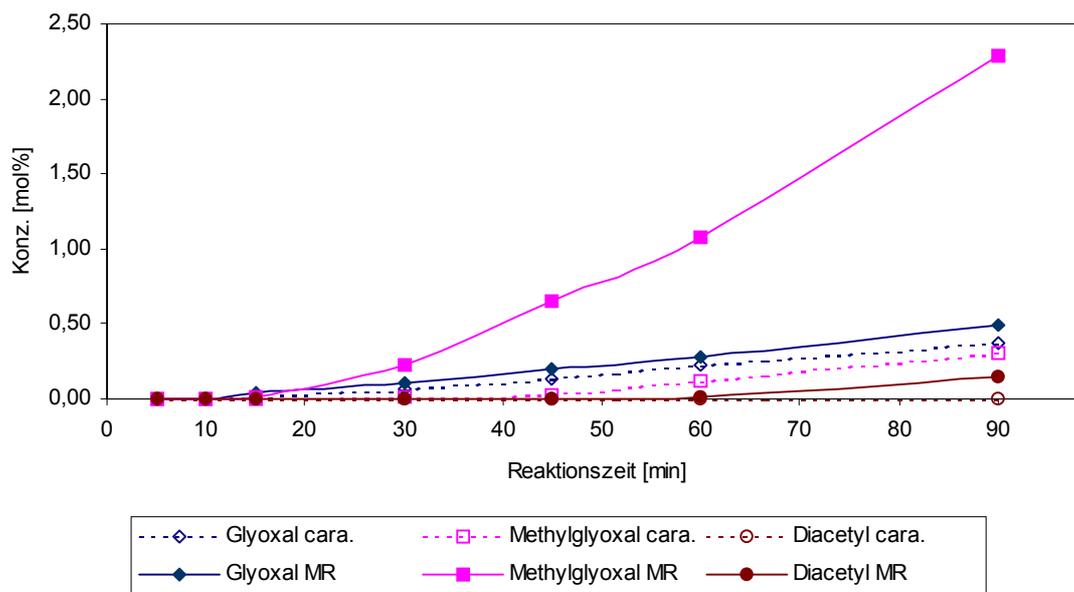


Abb. 29 Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Offensichtlich sind diejenigen Reaktionswege in der Maillard-Reaktion von Maltose, die zur Bildung von 1-Desoxyhexosulose und deren Abreaktion führen, durch die glycosidische Verknüpfung an C4 innerhalb des beobachteten Zeitraums blockiert oder zumindest stark gehemmt.

Auch aus Maltulose (Mlt) werden unter Caramelisierungsbedingungen (Mlt/OPD) nur wenige Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylgruppe gebildet. Nach 60 min ist noch kein Diacetyl entstanden und Glyoxal (0,15 mol%) sowie Methylglyoxal (0,1 mol%) sind nur in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abb. 30).

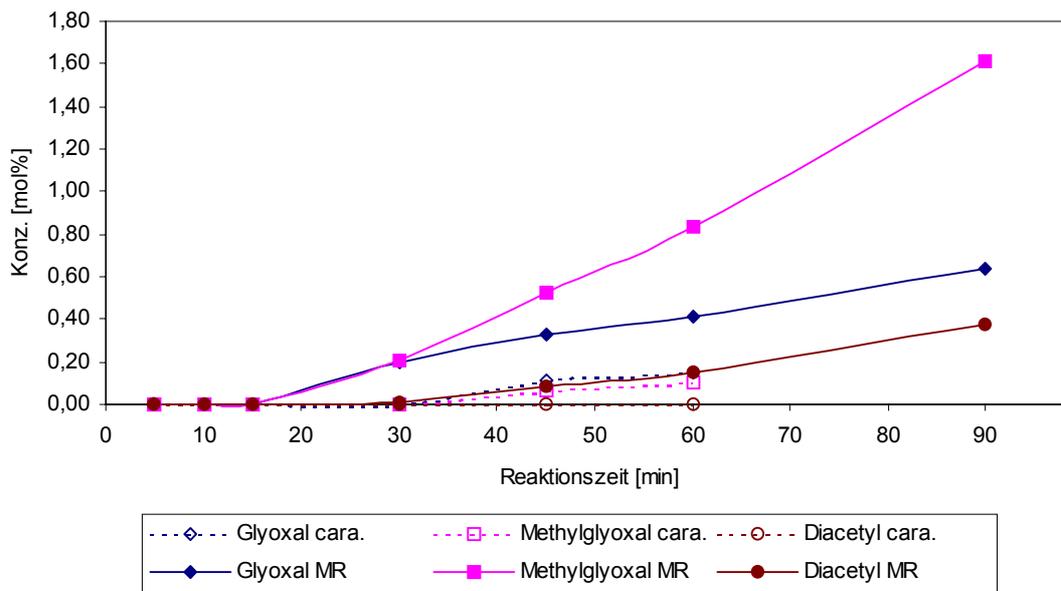


Abb. 30 Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltulose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltulose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Methylglyoxal dominiert wie in den Reaktionsgemischen mit Maltose auch bei der Thermolyse von Maltulose unter Maillard-Reaktionsbedingungen (Mlt/Gly/OPD). Es wird nach 90 min zu 1,61 mol% gefunden (Abb. 30). Allerdings entsteht bei der Reaktion der dimeren Ketose wie beim Monosaccharid eine etwas niedrigere Konzentration des C3-Bruchstücks als bei der Maillard-Reaktion von Maltose, einer Aldose.

Im Gegensatz dazu wird *Glyoxal* verstärkt aus Maltulose gebildet (0,63 mol% nach 90 min) und auch Diacetyl konnte nach Ablauf der beobachteten Reaktionszeit mit 0,37 mol% nachgewiesen werden (Abb. 30). Aus der verzögerten Bildung von Diacetyl unter Maillard-Reaktionsbedingungen und daraus, dass unter Caramelisierungsbedingungen auch am Ende der Reaktionszeit kein Diacetyl nachweisbar ist, lässt sich wiederum schließen, dass nicht die Maltulose selbst, sondern Intermediate der Maillard-Reaktion Ausgangsstoffe für die Bildung dieses C4-Fragmentes darstellen. Die erhöhte Bildung von Zuckerfragmenten und der verstärkte Abbau der Disaccharidstrukturen unter Maillard-Reaktionsbedingungen im Vergleich zur Caramelisierung lässt sich über unterschiedliche Reaktionswege erklären. Zum einen könnte Wasser, das bei der Reaktion von Aminosäure und Carbonylgruppe frei wird, zur verstärkten

Hydrolyse der glycosidischen Bindung führen, so dass durch eine höhere Monosaccharidkonzentration mehr Ausgangsstoffe für eine Fragmentierung zur Verfügung stehen. Zum anderen könnte Glycin am Abbau der Maltulose vom nichtreduzierenden Ende her beteiligt sein, wobei dann aus den Intermediaten Zuckerfragmente entstehen.

3.4 Neue Bildungswege für α -Dicarboyle aus Disacchariden

Für eine Fragmentierung von Disacchariden, beginnend am reduzierenden Ende, lassen sich in Abhängigkeit vom Ausgangsstoff verschiedene Produkte beschreiben. Da in den verwendeten Disacchariden der Weg über die 1-Desoxyhexosulose durch die glycosidische Verknüpfung an C4 blockiert oder zumindest behindert ist, kann die Bildung von Glyoxal oder Diacetyl nicht direkt über diese Verbindung laufen.

Eine Reaktion, in der die Aminosäure mit der freien glycosidischen OH-Gruppe reagiert und in der nachfolgend der Zuckerrest an C4 eliminiert wird, könnte allerdings den Abbau des Disaccharides einleiten.

Im Falle des Amadoriproduktes, eines frühen Reaktionsproduktes der Maillard-Reaktion von Maltose, befindet sich die Carbonylgruppe an C2. Das begünstigt die Spaltung zwischen C3 und C4 durch eine Reaktion im Sinne einer Retro-Aldolreaktion (Abb. 31). Unter Umwandlung der Carbonylgruppe in eine Alkoholatgruppe und durch Verschiebung der Bindungselektronen zerfällt die Zuckereinheit am reduzierenden Ende in zwei C3-Bruchstücke. Diese Reaktion könnte, verglichen mit Glyoxal und Diacetyl, die relativ starke Bildung von Methylglyoxal aus Maltose erklären.

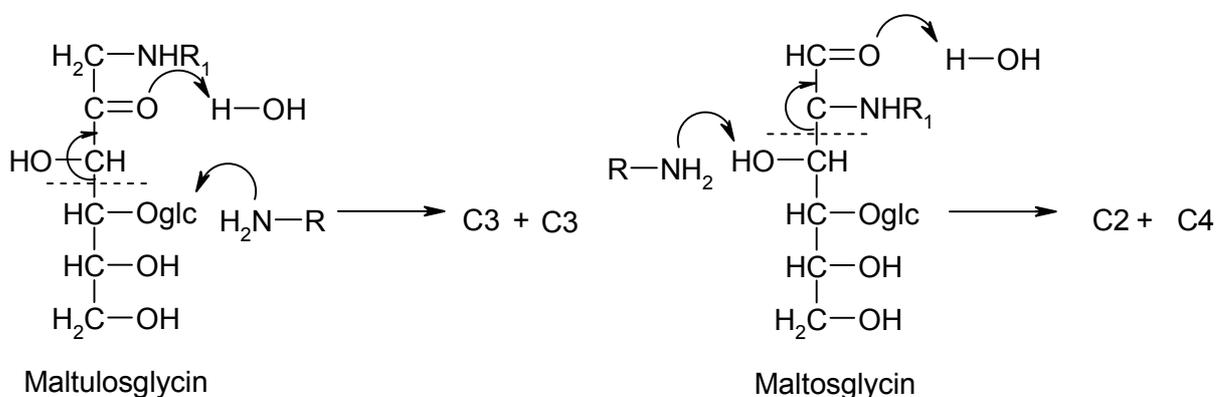


Abb. 31 Aminkatalysierte Fragmentierung des Amadori- und des Heynsproduktes von Maltose bzw. Maltulose

Die etwas geringere Bildung von Methylglyoxal aus Maltulose und die verstärkte Bildung von Glyoxal und Diacetyl unter Maillard-Reaktionsbedingungen lassen sich aus einer Retro-Aldolreaktion des Heynsproduktes erklären. In diesem Fall befindet sich die Carbonylgruppe an C1. Durch den Angriff des Elektronenpaares einer zweiten Aminosäure an der Hydroxylgruppe an C3 wird hier die Ausbildung einer Carbonylgruppe eingeleitet. Die Umwandlung der Carbonylgruppe an C1 in eine Alkoholatgruppe bewirkt dann die endgültige Verschiebung der Bindungselektronen und die Spaltung der C2-C3 Bindung.

4 Caramelisierung und Maillard-Reaktion im quasi Wasserfreien: Umsetzungen von D-Glucose, Maltose und Maltotriose mit Glycin und Fructosglycin in Anwesenheit von OPD

Zum Vergleich der Reaktivität von Monosacchariden mit der von Sacchariden mit steigendem Polymerisierungsgrad werden die Modellreaktionen unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen durchgeführt, die Prozessen in der Lebensmittelverarbeitung wie Rösten oder Reaktionen an der Oberfläche beim Braten und Backen entsprechen.

Neben kleineren Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur sind, wie unter 1.1.3. und 1.1.4. beschrieben, besonders Hexosulosen wichtige Intermediate bei der nichtenzymatischen Bräunung. Ihre Chinoxaline kann man mit der bisher verwendeten Gaschromatographie allerdings nur nach Derivatisierung der freien Hydroxylgruppen erfassen.

Um die notwendige Probenaufbereitung auf ein Minimum reduzieren zu können, wird eine HPLC-Methode eingesetzt, mit der neben den Zuckerfragmenten auch Dehydratisierungsprodukte von Hexosen mit α -Dicarbonylstruktur nachgewiesen werden können. Dabei werden die gebildeten Chinoxaline mittels HPLC an einer Umkehrphase (C18) aufgetrennt. Die Säulentemperatur beträgt 30 °C und es wird ein Methanol-Wasser-Gradient benutzt (s. 9.1.7.)

4.1 Caramelisierung unter quasi wasserfreien Bedingungen

4.1.1 Bildung von α -Dicarbonylverbindungen

Beginnend mit D-Glucose über Maltose und Maltotriose wird die Bildung von α -Dicarbonylen unter quasi wasserfreien Bedingungen untersucht. Dazu werden die Saccharide in Anwesenheit von OPD in verschlossenen Ampullen erhitzt. Im Caramelisierungsmodell für D-Glucose (Glc/OPD) werden insgesamt nur geringe Mengen α -Dicarbonyle gefunden.

Methylglyoxal (2,6 mol%) ist wie schon bei den Untersuchungen mittels Gaschromatographie auch bei dieser experimentellen Herangehensweise am Ende der Reaktionszeit, d. h. nach 180 min, das dominierende α -Dicarbonyl. Die Ergebnisse der beiden chromatographischen Methoden sind in guter Übereinstimmung.

1-Desoxyhexosulose und *3-Desoxyhexosulose* werden nur in geringen Mengen (jeweils weniger als 1 mol%) gebildet. Ihre Konzentration nimmt schon nach 60 min nicht mehr wesentlich zu. Das entspricht auch der Beobachtung, dass bereits nach 30 min der Großteil der D-Glucose verbraucht ist (s. 4.1.2.).

Es wird auch *1,4-Didesoxyhexosulose* im Caramelisierungsmodell von D-Glucose nachgewiesen, aber sie spielt mit einer Konzentration von 1,05 mol% (180 min) keine bedeutende Rolle bei der Umsetzung von D-Glucose.

Maltose besitzt bezüglich der Bildung von α -Dicarbonylen, wie auch schon unter 3.3. gezeigt, eine geringere Reaktivität als D-Glucose. Deshalb wird die Reaktionszeit auf 240 min ausgedehnt. Trotzdem können nur sehr geringe Mengen der untersuchten α -Dicarbonyle nachgewiesen werden.

Die Zuckerfragmente *Methylglyoxal* und *Glyoxal* entstehen auch nach einer Reaktionszeit von 240 min in einer Menge, die kleiner als 1 mol% , bei *1*- und *3-Desoxyhexosulose* sogar kleiner als 0,5 mol% (Abb. 32).

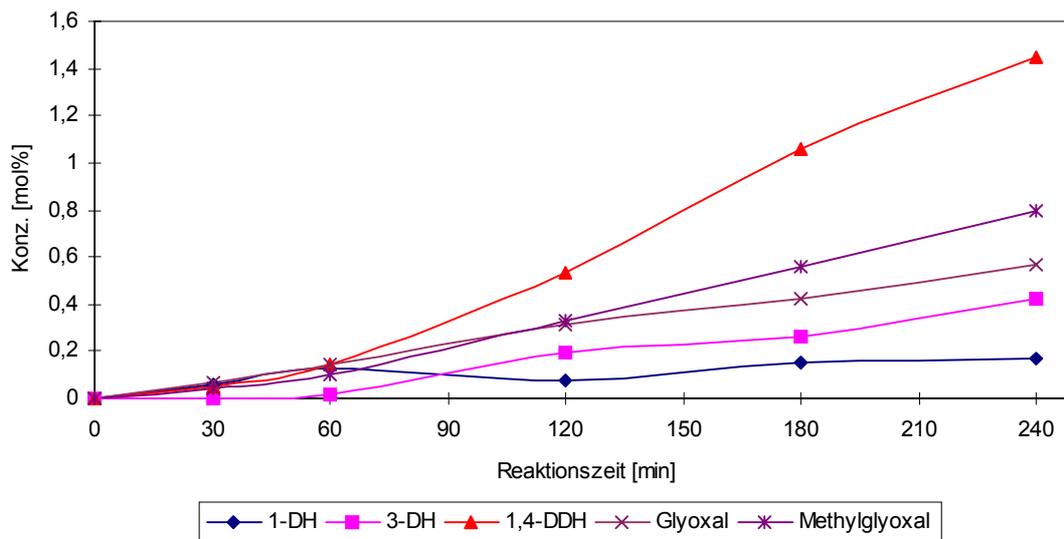


Abb. 32 Bildung von α -Dicarbylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol)

Nur *1,4-Didesoxyhexosulose* wird mit 1,4 mol% nach 240 min etwas stärker geformt und der Kurvenverlauf in Abb. 30 lässt eine Konzentrationszunahme auch über den beobachteten Zeitraum hinaus vermuten.

Noch langsamer verläuft die Bildung der α -Dicarbyle in Umsetzungen von Maltotriose (M3ose). Deshalb wurde hier die Reaktionszeit auf 480 min verlängert.

1,4-Didesoxyhexosulose ist, wie schon bei Maltose, auch bei der Thermolyse der Triose das dominierende α -Dicarbyl. Nach einer Reaktionszeit von 480 min wird es mit 3,9 mol% gefunden (Abb. 33).

Außer *1,4-Didesoxyhexosulose* werden keine weiteren Desoxyhexosulosen, sondern nur Zuckerfragmente mit α -Dicarbylstruktur in nennenswerten Mengen gefunden.

Am Ende der Reaktionszeit liegen *Methylglyoxal* mit 2,9 mol% und *Glyoxal* mit 1,67 mol% vor. Bei der Betrachtung der Konzentration-Zeit-Daten für die korrespondierenden Chinoxaline ist festzustellen, dass die Bildung der Zuckerfragmente nach 360 min stagniert und nur *1,4-Didesoxyhexosulose* auch im späteren Verlauf der Reaktion eine Rolle spielt (Abb. 33).

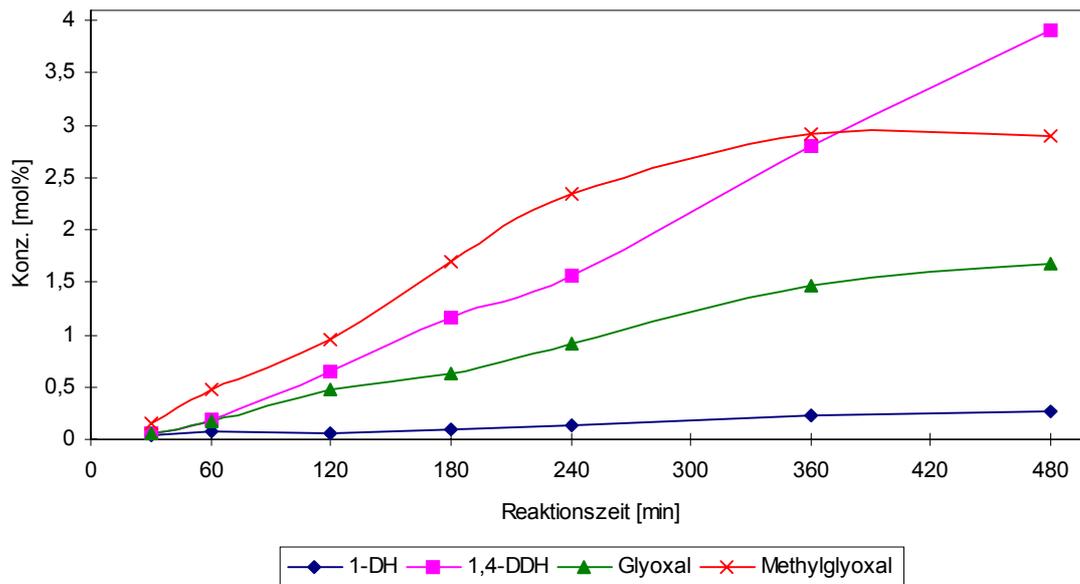


Abb. 33 Bildung von α -Dicarbylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/OPD (1 mmol: 1 mmol)

Insgesamt werden bei allen drei Ausgangsverbindungen während der Caramelisierung unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nur geringe Mengen an α -Dicarbylen gebildet.

Während aus dem Monosaccharid D-Glucose hauptsächlich Methylglyoxal und kaum Desoxyhexosulosen entstehen, wird im Unterschied dazu aus beiden Oligosacchariden verstärkt 1,4-Didesoxyhexosulose gebildet.

4.1.2 Abbau der Kohlenhydratkomponente

D-Glucose wird unter Caramelisierungsbedingungen (Glc/OPD) in Anwesenheit von OPD sehr schnell abgebaut. Schon nach 30 min sind mehr als zwei Drittel umgesetzt (Tab. 01). Die schnelle Umsetzung des Monosaccharides ist nicht allein durch die Bildung von Chinoxalinen bzw. α -Dicarbylen zu erklären, vielmehr sollten hier auch andere Prozesse wie die Bildung von 1,6- β -Anhydroglucose, die mittels HPTLC im Reaktionsgemisch qualitativ detektiert werden konnte, eine Rolle spielen. Da Anhydrozucker typische Reaktionsprodukte für eine Caramelisierung unter wasserarmen Bedingungen sind, bestätigt der Nachweis von 1,6- β -Anhydroglucose im verwendeten Modellsystem, dass das

untersuchte Reaktionsmodell hinsichtlich des Produktspektrums mit Modellen ohne den Zusatz eines Abfangreagenz' vergleichbar ist.

Der Abbau von Maltose (Mal/OPD) verläuft langsamer als der von D-Glucose. Trotzdem ist auch hier nur noch ein geringer Teil des Disaccharides nach 60 min nachweisbar und am Ende der untersuchten Reaktionszeit (240 min) ist immer noch eine kleine Menge Maltose vorhanden (Tab. 01). Der leichte Überbefund bei 240 min ist wahrscheinlich auf experimentelle Fehler zurückzuführen.

Auch bei der Reaktion von Maltotriose (M3ose/OPD) wird wie bei D-Glucose und Maltose schon während der ersten 60 min der Großteil des Saccharides umgesetzt. Allerdings verbleibt Maltotriose länger im Reaktionsgemisch als die anderen beiden Saccharide. Nach 480 min Reaktionszeit sind immer noch mehr als 25 mol% der Maltotriose im Gemisch vorhanden (Tab. 01). Wie auch in Caramelisierungsmodellen ohne OPD werden im untersuchten Gemisch Reaktionsprodukte der Transglycosidierung gefunden. Es handelt sich hierbei um Saccharide mit höherem Polymerisierungsgrad und mit neugebildeten glycosidischen Verknüpfungen, die mit Hilfe der HPTLC qualitativ nachgewiesen werden können (Häseler, 2000).

Tab. 01 Abbau von D-Glucose, Maltose und Maltotriose in Caramelisierungsmodellen in Gegenwart von OPD im quasi wasserfreien Milieu

Reaktionszeit [min]	0	30	60	120	180	240	360	480
mol% D-Glucose	100	30	13	9	5	-	-	-
mol% Maltose	100	19	15	7	6	8	-	-
mol% Maltotriose	100	36	31	28	32	31	29	26

4.1.3 Isomerisierung

Kroh et al. (1996) berichten, dass bei der nichtenzymatischen Bräunung in Abwesenheit der Aminosäure die Isomerisierung von Aldosen zu Ketosen einen wichtigen Reaktionsweg darstellt.

In den Reaktionsgemischen von D-Glucose (Glc/OPD) entsteht während der Thermolyse D-Fructose. Bereits nach 30 min wird unter den gewählten Reaktionsbedingungen mit 6,1 mol% die höchste Konzentration nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt der Gehalt an D-Fructose wieder ab: nach 60 min sind noch 5 mol% vorhanden: nach 120 min nur noch 4 mol% und nach 180 min, am Ende der Reaktionszeit, lediglich 3,5 mol% (ohne Abb.). Die gebildete D-Fructose unterliegt während der Thermolyse ebenfalls der Caramelisierung, z. B. ist sie, wie unter 3.2. beschrieben, leicht in der Lage HMF zu bilden.

Auch Maltose (Mal/OPD) wird unter Caramelisierungsbedingungen zu Maltulose umgewandelt. Allerdings kann sie nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Während des gesamten Experiments nimmt die Konzentration an Maltulose zwar kontinuierlich zu, erreicht jedoch nie mehr als 0,5 mol%. Diese geringe Konzentration muss nicht ausschließlich auf eine verzögerte Bildung von Maltulose zurückzuführen sein, ebensogut könnte die Ketose auch schnell weiter reagieren, so dass nur eine kleine „steady-state“-Konzentration nachweisbar ist.

Höchstwahrscheinlich wird auch aus Maltotriose (M3ose/OPD) die entsprechende Ketose gebildet. Mit Hilfe der HPTLC ist es möglich, Maltotriulose mit hoher Wahrscheinlichkeit einem DC-Spot qualitativ zuzuordnen.

4.1.4 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad

In den Caramelisierungsgemischen der Oligosaccharide Maltose und Maltotriose werden mittels HPLC/PAD und HPTLC D-Glucose bzw. Maltose nachgewiesen.

Allerdings ist in den Modellen im Laufe der Reaktion nur eine unwesentlich höhere Konzentration der Kohlenhydrate mit niedrigerem Polymerisierungsgrad nachweisbar als schon im Ausgangsstoff als Verunreinigung vorhanden sind.

Bei der Caramelisierung von Maltose (Mal/OPD) werden während der Reaktion maximal 0,5 mol% mehr D-Glucose detektiert als in der thermisch

unbehandelten Probe (0,84 mol%, Abb. 34). Berücksichtigt man allerdings die höhere Reaktivität von D-Glucose im Vergleich zu Maltose, dann ist dies ein deutliches Zeichen dafür, dass die glycosidische Bindung des Disaccharides auch unter Caramelisierungsbedingungen im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu gespalten wird. Dieser Bindungsbruch kann im Zuge der Entstehung des Glycosylkations erfolgen, das während der Caramelisierung typischerweise zur Anhydrozuckerbildung und zur Entstehung von Transglycosidierungsprodukten führt (Häseler und Kroh, 1998).

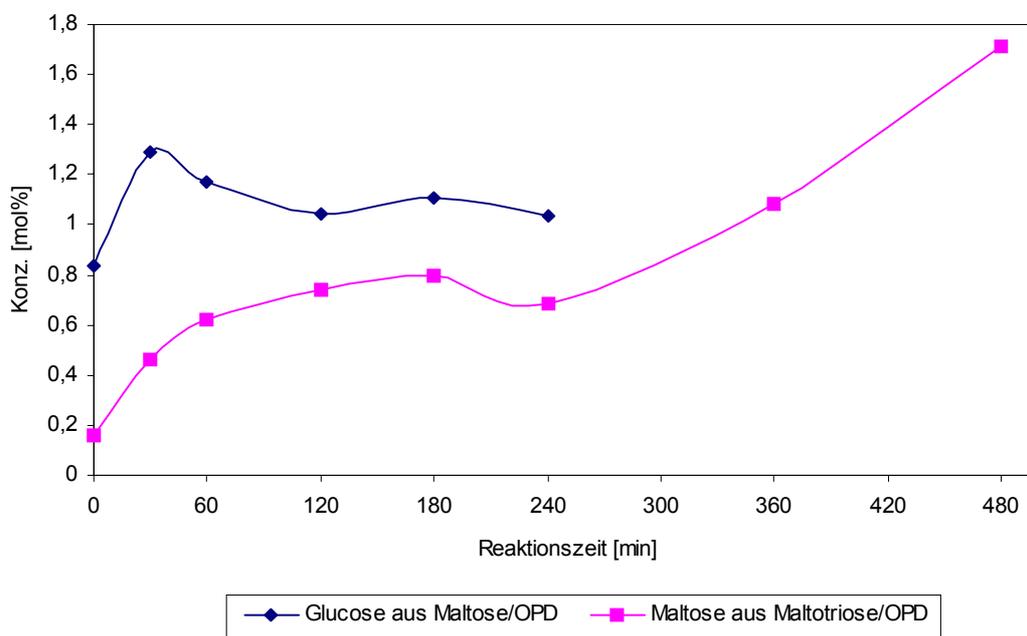


Abb. 34 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad bei der Caramelisierung unter quasi wasserfreien Bedingungen

Auch der Abbau von Maltotriose (M3ose/OPD) zu Maltose erfolgt eher langsam und in geringem Umfang. Während der langen Reaktionszeit ist eine Steigerung der Maltosekonzentration von 0,15 mol% in der unbehandelten Probe auf 1,71 mol% nach 480 min zu verzeichnen (Abb. 34). Auch hier ist wieder die Spaltung der glycosidischen Bindung durch Bildung des Glycosylkations der wahrscheinlichste Reaktionsweg. Durch den relativ trägen Abbau des Ausgangsstoffes liegt offensichtlich über den ganzen Reaktionszeitraum hinweg genügend Maltotriose vor, so dass ein stetiger Anstieg der Maltosekonzentration bewirkt wird.

4.2 Maillard-Reaktion unter quasi wasserfreien Bedingungen

In den Modellmischungen der Maillard-Reaktion wird Aminosäure Glycin (Gly) verwendet. Zur Bestimmung der gebildeten α -Dicarbone wird den Reaktionsgemischen wiederum OPD zugesetzt. So kann durch den Vergleich mit den entsprechenden Caramelisierungsmodellen der Einfluss der Aminosäure auf die Bildung der α -Dicarbone relativ genau charakterisiert werden.

Auch alle anderen Reaktionsprodukte (4.2.2.–4.2.5) wurden für die OPD-haltigen Reaktionsgemische bestimmt.

4.2.1 Bildung von α -Dicarbenen

In Maillard-Reaktionsgemischen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD) ist eine sehr starke Erhöhung der α -Dicarbonebildung gegenüber der Caramelisierung zu verzeichnen. Besonders die Bildung von Hexosulosen wird stark durch die Anwesenheit von Glycin gefördert. Im Vergleich zum Modell der Caramelisierung werden hier nun mehr Hexosulosen als C₂- C₃ und C₄-Zuckerfragmente mit α -Dicarbonestruktur gebildet. Die Summe an gebildeter 1-Desoxyhexosulose, 3-Desoxyhexosulose und 1,4-Didesoxyhexosulose beträgt mehr als 11 mol% gegenüber insgesamt 7 mol% für Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl.

α -Dicarbone werden innerhalb der Maillard-Reaktion wahrscheinlich durch die aminkatalysierte Umlagerung und anschließende vinyloge β -Eliminierung gebildet, während sie in der Caramelisierung eher durch Fragmentierung des Zuckers also Retro-Aldolreaktion entstehen (s. 1.1.4.).

Aber auch die Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonestruktur ist in der Maillard-Reaktion im Vergleich zur Caramelisierung verstärkt.

Methylglyoxal wird im entsprechenden Reaktionsgemisch mit D-Glucose (Glc/Gly/OPD) sehr schnell gebildet. Schon nach 60 min erreicht das korrespondierende Chinoxalin eine Konzentration von 3,6 mol% und nach 180 min sind es sogar 5,5 mol% (Abb. 35). Diese hohe Methylglyoxalkonzentration ist im Vergleich zur Caramelisierung wahrscheinlich durch zusätzliche Bildungswege über die Spaltung von Schiff'scher Base oder (enolisierter) 3-Desoxyhexosulose zu erklären (Weenen, 1998; Hayashi et al., 1986a).

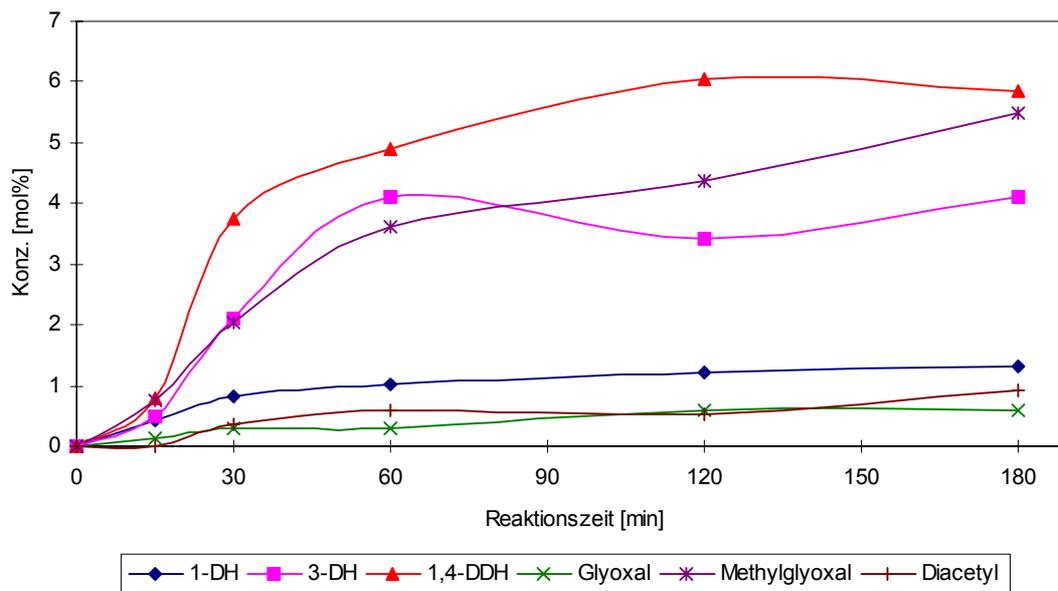


Abb. 35 Bildung von α -Dicarbylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Glyoxal und *Diacetyl* werden unter den gegebenen Bedingungen nur in geringen Mengen gebildet. Beide Verbindungen sind auch nach 180 min zu weniger als 1 mol% im Reaktionsgemisch enthalten.

Da die Enolisierung des Aminosäure-Zucker-Adduktes in Abhängigkeit vom pH-Wert entweder stärker in Richtung 1,2-Enaminol oder 2,3-Endiol abläuft, ist es weiterhin interessant, das Verhältnis von 3-Desoxyhexosulose zu 1-Desoxyhexosulose, den Dehydratisierungsprodukten dieser Verbindungen, zu betrachten. Nach Hodge (1967) sollte sich dieses Verhältnis im neutralen, schwach basischen Milieu (≈ 7) gegenüber der stark sauren Lösung zugunsten des 1-Desoxyhexosulose verschieben.

In den quasi wasserfrei gebräunten Proben wird nach Wasserzugabe ein neutraler bis schwach saurer pH-Wert gemessen (6,8-5,5). Dementsprechend müsste die 1-Desoxyhexosulose bereits zu einem maßgeblichen Anteil gebildet werden.

3-Desoxyhexosulose (4,1 mol% nach 180 min) wird jedoch im hier untersuchten Modell dreimal mehr gebildet als *1-Desoxyhexosulose* (1,3 mol% nach 180 min, Abb. 35).

1,4-Didesoxyhexosulose entsteht neben 1-Desoxyhexosulose und 3-Desoxyhexosulose in vergleichbarer Konzentration (5,8 mol% nach 180 min,

Abb. 35). Nedvidek et al. (1992) erklären ihre Bildung über den Strecker-Abbau der Aminosäure, da in Anwesenheit von nicht-Strecker-aktiven Aminosäuren wesentlich weniger 1,4-Didesoxyhexosulose gebildet wird.

Das unerwartete Verhältnis von 3-Desoxyhexosulose zu 1-Desoxyhexosulose lässt sich also eventuell durch die hohe Konzentration an 1,4-Didesoxyhexosulose erklären und unterstützt die Vermutung Nedvideks, dass die 1-Desoxyhexosulose über den Weg des Strecker-Abbaus weiter zu 1,4-Didesoxyhexosulose umgewandelt werden kann (s. Abb. 02, S. 7).

Eine dramatische Veränderung des Produktspektrums ist im Maillard-Reaktionsgemisch von Maltose zu verzeichnen (Malt/Gly/OPD).

Lediglich 2,94 mol% *Methylglyoxal* und 0,97 mol% *Glyoxal* werden nach 240 min Reaktionszeit als Chinoxaline gefunden (Abb. 36).

Auch *1-Desoxyhexosulose* und *3-Desoxyhexosulose* sind nur in sehr geringen Mengen enthalten.

Demgegenüber ist die Konzentration an *1,4-Didesoxyhexosulose* im Vergleich zur Caramelisierung um ein Vielfaches erhöht. Sie nimmt im Verlauf der ersten drei Stunden kontinuierlich zu (17,71 mol% nach 180 min), danach verläuft die Konzentrations-Zeit-Kurve flacher, bis sie nach 240 min ist einen Wert von 18,09 mol% erreicht (Abb. 36).

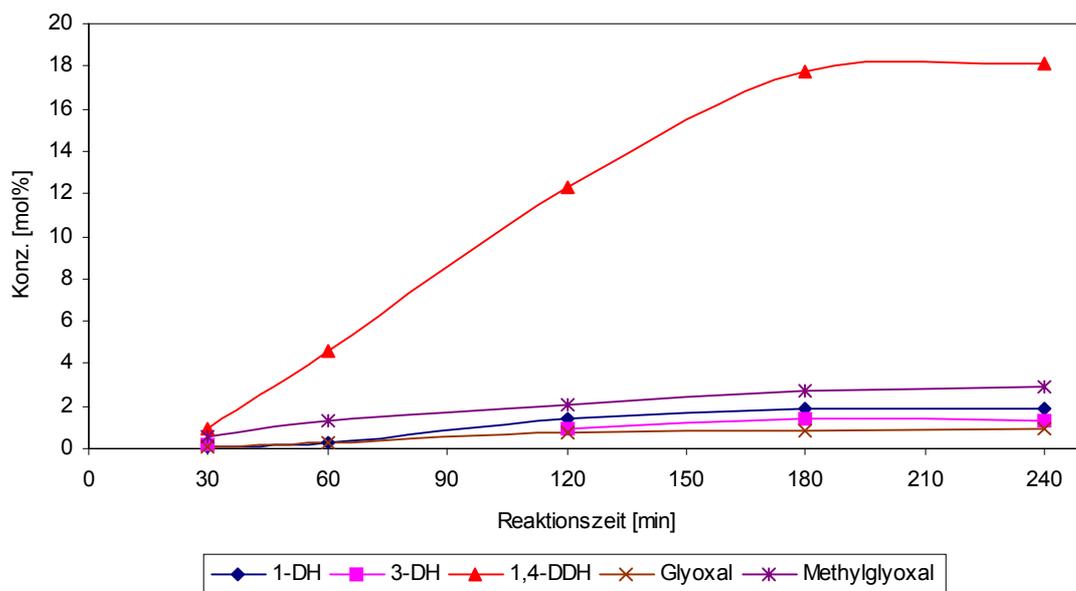


Abb. 36 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Ganz offensichtlich läuft bei der Reaktion des Disaccharides ein anderer, bisher nicht bekannter Mechanismus für die Bildung von α -Dicarbonylen ab.

Durch die glycosidische Bindung sind die Reaktionswege, die zu 1-Desoxyhexosulose und 3-Desoxyhexosulose führen, blockiert. Zwar könnte die dafür nötige vinyloge β -Eliminierung ablaufen, aber dann würden nur die Osulosen des Disaccharides entstehen, da der glycosidische Rest noch an C4 gebunden bleibt.

Da kein Referenzmaterial vorhanden ist, ist es allerdings nicht möglich, diese Intermediate der Maillard-Reaktion zu bestimmen, allerdings waren im HPLC-Chromatogramm auch keine anderer größerer Peaks mit charakteristischem UV-Vis-Spektrum in dem für diese Chinoxaline zu erwartenden Bereich zu erkennen. Angesichts der hohen Konzentration an 1,4-Didesoxyhexosulose scheint aber gerade die Eliminierung des Restes an C4 eine sehr wichtige Rolle bei der Maillard-Reaktion von Maltose zu spielen. Unter 4.3. wird ein möglicher Bildungsweg für die 1,4-Didesoxyhexosulose aufgezeigt.

Ganz ähnliche Ergebnisse werden bei den Maillard-Reaktionsgemischen mit Maltotriose gefunden (M3ose/Gly/OPD). Zwar ist die Reaktion innerhalb der ersten zwei Stunden eher träge, aber nach 240 min Reaktionszeit ist ein steiler, kontinuierlicher Anstieg der 1,4-Didesoxyhexosulosekonzentration zu verzeichnen.

Die Konzentration von *1,4-Didesoxyhexosulose* beträgt nach 480 min 16,04 mol% und dominiert klar bei den untersuchten α -Dicarbonylverbindungen.

Außer *Methylglyoxal*, das nach 240 min eine maximale Konzentration von 5,89 mol% erreicht, entstehen alle anderen untersuchten Chinoxaline bzw. α -Dicarbonyle in vernachlässigbar geringen Konzentrationen. (Abb. 37)

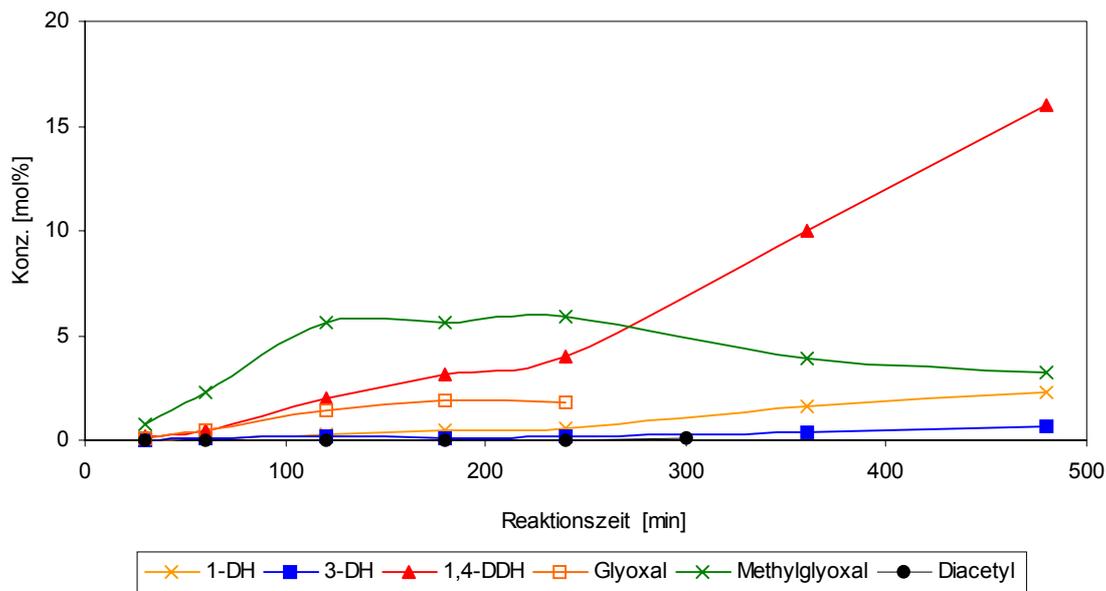


Abb. 37 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Dieses Ergebnis bestätigt nachdrücklich die Bedeutung der 1,4-Di-desoxyhexosulosebildung für die Maillard-Reaktion von Oligosacchariden im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu.

4.2.2 Abbau der Kohlenhydratkomponente

D-Glucose wird unter Maillard-Reaktionsbedingungen noch schneller abgebaut als im Modell für die Caramelisierung. Zwar werden in beiden Systemen schon innerhalb der ersten 30 min über zwei Drittel der D-Glucose umgewandelt, aber die Anwesenheit der Aminosäure bewirkt, dass die D-Glucose nach 120 min Reaktionszeit vollständig umgesetzt ist, während im Caramelisierungsmodell sogar noch nach 180 min 5 mol% des Monosaccharides im Reaktionsgemisch enthalten sind (Tab. 02).

Für den Abbau des Disaccharides ist kein sehr großer Unterschied zwischen Caramelisierung und Maillard-Reaktion feststellbar.

Der Abbau der Maltose erfolgt langsamer als der von D-Glucose. Aber auch hier wird ein Großteil des Disaccharides in den ersten 30 min umgewandelt. Zu diesem Zeitpunkt haben bereits über 80 mol% der Maltose reagiert (Tab. 02). Nach der anfänglich sehr schnellen Umsetzung verläuft die Konzentrations-Zeit-

Kurve über die restliche Reaktionszeit hinweg auch unter Maillard-Reaktionsbedingungen relativ konstant auf einem niedrigen Niveau, und am Ende der Reaktionszeit ist stets noch eine geringe Menge an Maltose vorhanden (5 mol%, Tab. 02). Sowohl für die Bestimmung der Maltose als auch für die der Maltotriose ist eine leichte Unstetigkeit der Meßergebnisse zu beobachten, die auf experimentelle Fehler zurückgeführt werden könnte.

Auch die Abnahme der Maltotriose im entsprechenden Maillard-Reaktionsmodell ist innerhalb der ersten Stunde am schnellsten. Allerdings ist zu beobachten, dass mit zunehmendem Polymerisierungsgrad der Kohlenhydrate die Umsetzungen träger verlaufen (Tab. 02). Nach 30 min ist die Umwandlung von ca. zwei Drittel der Maltotriose abgeschlossen.

Bei der Triose lässt sich wieder ein relativ deutlicher Unterschied zwischen Caramelisierung und Maillard-Reaktion erkennen. Zwar wird auch Maltotriose in Gegenwart von Glycin während des beobachteten Zeitraums nicht vollständig verbraucht, aber ihre Konzentration ist nach 480 min mit 17 mol% eindeutig geringer als in Abwesenheit von Glycin (s. 4.1.2. Tab. 01).

Tab. 02 Abbau von D-Glucose, Maltose und Maltotriose in Maillard-Reaktionsmodellen in Gegenwart von OPD im quasi wasserfreien Milieu

Reaktionszeit [min]	0	30	60	120	180	240	360	480
mol% D-Glucose	100	11	1	>0.5	-	-	-	-
mol% Maltose	100	11	16	11	2	5	-	-
mol% Maltotriose	100	29	29	28	29	26	22	17

4.2.3 Isomerisierung

Obwohl auch unter Maillard-Reaktionsbedingungen eine Isomerisierung von D-Glucose zu D-Fructose zu erwarten gewesen wäre, kann in den untersuchten Gemischen keine D-Fructose nachgewiesen werden.

Ein Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass D-Glucose, der Ausgangsstoff für die Isomerisierung, in Anwesenheit von Glycin so schnell abgebaut wird, dass die Isomerisierung im Vergleich zur Reaktion der Aldose mit der Aminosäure keine Rolle spielt. Ein anderer Grund wäre, dass die D-Fruktose zwar unter Maillard-Reaktionsbedingungen gebildet wird, selbst aber sehr schnell mit der Aminosäure abreagiert und somit nicht mittels HPTLC detektiert werden kann.

Im Reaktionsgemisch mit Maltose lässt sich das Isomerisierungsprodukt Maltulose nachweisen. Allerdings entsteht es erst nach 120 min in einer sehr geringen Konzentration (0,72 mol%), die im weiteren Reaktionsverlauf wieder absinkt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Isomerisierung eine relativ langsame Reaktion im Vergleich mit der Amino-Carbonyl-Reaktion ist und für die Maillard-Reaktion der D-Glucose eine geringe Bedeutung hat. Da aber die Maillard-Reaktion für Maltose langsamer verläuft als für D-Glucose und über den gesamten Reaktionszeitraum hinweg Maltose im Reaktionsgemisch vorhanden ist, erlangt auch die langsamere Isomerisierung eine gewisse Bedeutung.

Maltotriose selbst enthält schon geringe Mengen einer Ketose. Jedoch steht kein Referenzmaterial für eine eindeutige Identifizierung von Maltotriulose zur Verfügung, so dass die Entstehung von Maltotriulose während der Maillard-Reaktion nur mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Über den beobachteten Zeitraum ist keine Zunahme der Maltotriulosekonzentration festzustellen.

4.2.4 Bildung des Amadoriproduktes

Da das Amadoriprodukt lange Zeit als Schlüsselintermediat in der frühen Phase der Maillard-Reaktion galt, wird es auch in den vorliegenden Reaktionsgemischen quantifiziert.

Schon nach 30 min ist mit 8,9 mol% die höchste Konzentration an Fructosglycin im Gemisch D-Glucose/Glycin/OPD nachweisbar (Abb. 38). Für den früheren Reaktionszeitraum sind keine Daten bekannt, so dass über die Lage des Maximums keine präzisen Aussagen getroffen werden können. Auf Grund der im weiteren Verlauf der Reaktion stark verringerten Konzentration an D-Glucose wird im nachfolgenden Zeitraum weniger Amadoriprodukt gebildet und schließlich

überwiegt die Abreaktion zu Intermediaten der fortgeschrittenen Phase der Maillard-Reaktion.

So nimmt die Konzentration von Fructosglycin schon nach 60 min wieder ab und sinkt auf 7,34 mol%, da die D-Glucose zu diesem Zeitpunkt beinahe vollständig abgebaut ist. Am Ende der Reaktionszeit liegen nur noch 1,87 mol% des Analyten vor (Abb. 38).

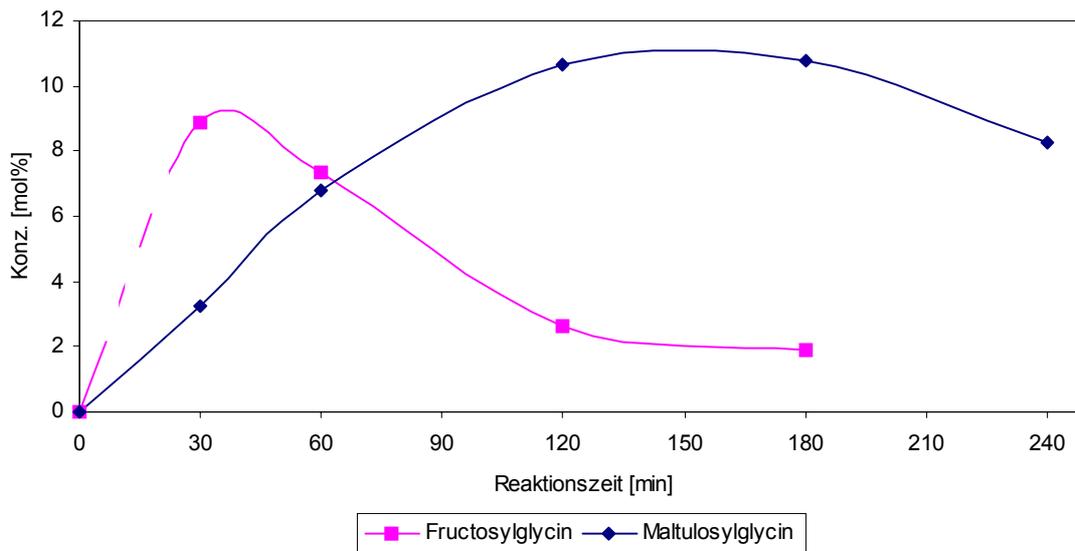


Abb. 38 Bildung von Fructosglycin aus D-Glucose/Glycin/OPD und von Maltosglycin aus Maltose/Glycin/OPD in Maillard-Reaktionsmodellen im quasi wasserfreien Milieu

Dieses Ergebnis bestätigt, dass sich das untersuchte OPD-haltige Modellgemisch wie ein typisches Maillard-Reaktionsgemisch verhält, denn auch hier ist das Fructosglycin ein Produkt der frühen Phase der Maillard-Reaktion, das schnell weiterreagiert.

Das Amadoriprodukt aus Maltose und Glycin wird langsamer gebildet als das des Monosaccharides. Die Bildung von Maltosglycin ist über einen längeren Zeitraum möglich, da auch die Abnahme von Maltose verzögert ist (s. 4.2.2). Die Konzentration von Maltosglycin steigt in den ersten zwei Stunden langsam an und erreicht mit 10,63 mol% nach 120 min das Maximum (Abb. 38). Neben der relativ langsamen Bildung des Amadoriproduktes scheint auch seine Weiterreaktion verzögert zu sein. Die Kurve für das Reaktionsgemisch des Disaccharides verläuft im Maximum wesentlich weniger spitz als die für

Fructosglycin. Am Ende der untersuchten Reaktionszeit ist mit 8,26 mol% noch immer ein großer Teil des Amadoriproduktes detektierbar (Abb. 38).

Mittels HPTLC kann auch im Maillard-Reaktionsgemisch von Maltotriose das Amadoriprodukt zumindest qualitativ zugeordnet werden. Außer dem Amadoriprodukt von Maltotriose werden im Reaktionsgemisch weder das Amadoriprodukt von D-Glucose noch das von Maltose gefunden.

4.2.5 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad

In Maillard-Reaktionsmodellen von Maltose und Maltotriose sind Kohlenhydrate mit kleinerem Polymerisierungsgrad als der der Ausgangsstoffe vorhanden. Im Maillard-Reaktionsmodell von Maltose ist relativ viel D-Glucose nachweisbar. Nach 60 min erreicht sie eine maximale Konzentration von 3,78 mol% und fällt danach wieder langsam ab, bis sie am Ende der untersuchten Reaktionszeit einen Wert von 1,12 mol% erreicht (Abb. 39). Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da die höchste Konzentration an D-Glucose in einem Zeitraum gebildet wird, in dem auch der Großteil an 1,4-Didesoxyhexosulose entsteht. Außerdem entstehen diese verhältnismäßig hohen Konzentrationen an D-Glucose und 1,4-Didesoxyhexosulose nur in Gegenwart von Glycin, so dass geschlussfolgert werden kann, dass beide Verbindungen Produkte ein und desselben Abbaumechanismus sind. Im weiteren Text soll dieser Reaktionsweg als „Peeling Off“-Mechanismus bezeichnet werden. Er wird unter 4.3. detailliert erörtert. Der hohen Reaktivität von D-Glucose unter Maillard-Reaktionsbedingungen ist es wahrscheinlich zuzuschreiben, dass weniger D-Glucose als 1,4-Didesoxyhexosulose gefunden wird (s. auch 4.2.2.).

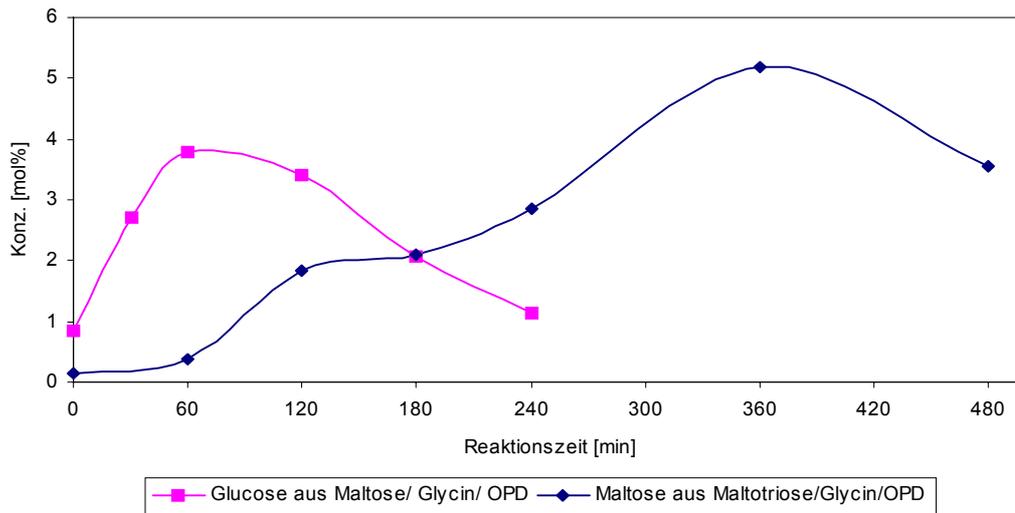


Abb. 39 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisationsgrad bei der Maillard-Reaktion von Maltose und Maltotriose unter quasi wasserfreien Bedingungen

Analog zu den für Maltose erhaltenen Ergebnissen werden auch in der Maillard-Reaktion von Maltotriose beträchtliche Mengen an Maltose gebildet. Die höchste Konzentration wird hier nach 360 min Reaktionszeit mit 5,19 mol% detektiert, nach 480 min sind noch 3,59 mol% Maltose im Reaktionsgemisch enthalten. Nachdem die maximale Konzentration von Maltose, verglichen mit der von D-Glucose in der Maillard-Reaktion von Maltose, erst relativ spät erreicht wird, sinkt sie auch relativ langsam ab. Die Abnahme der Maltosekonzentration lässt sich neben dem Abbau durch die Maillard-Reaktion zum einen und durch die verringerte Menge an Maltotriose zum anderen, aber auch durch die Tatsache, dass Maltose selbst wieder im Sinne einer „Peeling Off“-Reaktion reagiert, erklären.

Da bei der Maillard-Reaktion von Maltotriose im Unterschied zur Bildung von Maltose unter Caramelisierungsbedingungen eine wesentlich höhere Konzentration des Disaccharides erreicht wird, ist anzunehmen, dass die Spaltung des Maltotriosemoleküls nur zu einem geringen Teil über die Bildung eines Glucosylkations verläuft. Der Hauptteil an Maltose entsteht vermutlich wieder auf dem Wege des „Peeling Off“-Mechanismus. Die Bildung von Maltose setzt verstärkt zu einem Zeitpunkt ein, zu dem auch 1,4-Didesoxyhexosulose mit erhöhter Geschwindigkeit entsteht. Die gebildete Maltose kann außerdem im weiteren Verlauf der Reaktion durch einen erneuten „Peeling Off“-Schritt zu einem weiteren Molekül 1,4-Didesoxyhexosulose reagieren.

Die geringere Reaktivität der glycosidischen OH-Gruppe (Bräunungsaktivität in der nichtenzymatischen Bräunung) von Maltotriose im Vergleich zu Maltose und D-Glucose oder insgesamt von Sacchariden mit höherem Polymerisierungsgrad gegenüber Mono- und Disacchariden ist bereits länger bekannt (Wedzicha und Kedward, 1995) und erklärt die längere Induktionsphase bei der Bildung der untersuchten Reaktionsprodukte aus Maltotriose.

4.3 „Peeling Off“ als Reaktionsweg für die Bildung von 1,4-Didesoxyhexosulose

Für die starke Bildung von 1,4-Didesoxyhexosulose in Maillard-Reaktionsgemischen von Oligosacchariden wird die glycosidische 1→4-Verknüpfung verantwortlich gemacht. Nur die Bildung der 1,4-Didesoxyhexosulose erlaubt in diesem Fall die Abspaltung der Hexosulosen vom reduzierenden Ende der Saccharidkette durch die Eliminierung des glycosidischen Restes an C4.

Für den Nachweis der unterschiedlichen Verknüpfung von Polysacchariden beschrieben Morita et al. (1983) zum ersten Mal im alkalischen Reaktionsmilieu eine solche „Peeling Off“-Reaktion am reduzierenden Ende. In der zitierten Studie wurde ebenfalls OPD als Abfangreagenz für die gebildeten α -Dicarbonyle verwendet. Die Autoren stellten fest, dass überwiegend das Chinoxalin im Reaktionsgemisch enthalten war, das von einem α -Dicarbonyl mit Desoxygruppe am Kohlenstoff der ursprünglichen Verknüpfungsstelle (bei 1→4-Glucanen C4) abgeleitet ist. Die extreme Zunahme von 1,4-Didesoxyhexosulose in Gegenwart von Glycin deutet darauf hin, dass auch unter Maillard-Reaktionsbedingungen bevorzugt ein „Peeling Off“-Mechanismus beim Abbau des Oligosaccharides abläuft.

In dem hier vorgeschlagenen Mechanismus (Gesamtschema Abb. 42) katalysiert Glycin zunächst die Umlagerungsreaktion am reduzierenden Ende des α -Glucans. Über die Schiff'sche Base, das Enaminol und das Amadoriprodukt entsteht eine 2,3-Endiolstruktur. Durch eine vinyloge β -Eliminierung, dargestellt in Abb. 40, ist diese Verbindung nun in der Lage, zu 1-Amino-1,4-didesoxyhexosulose (Beck, et al. 1988) zu reagieren.

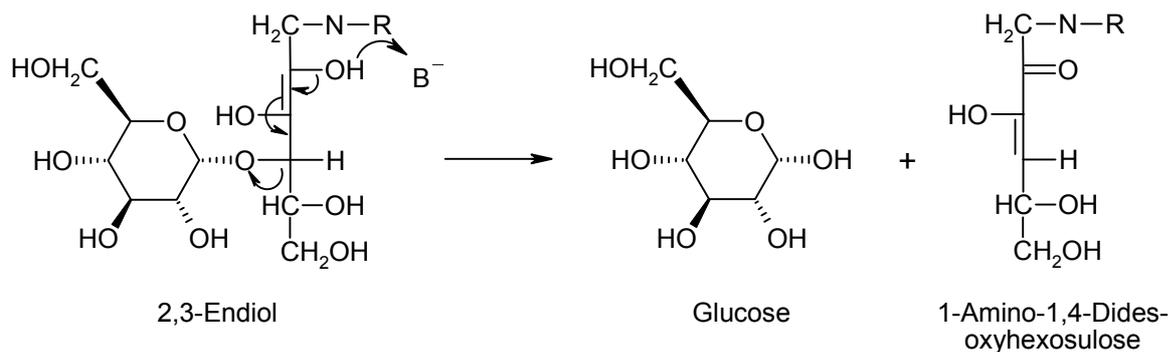


Abb. 40 Vinylloge β -Eliminierung des glycosidischen Restes aus der Endiolstruktur des Maltose-Glycin-Adduktes

Auf dem gleichen Reaktionsweg könnte die 2,3-Endiolverbindung aber auch zuerst die Aminogruppe an C1 abspalten.

Welcher der beiden Substituenten (glycosidischer Rest oder Aminosäure) zuerst aus dem Zuckermolekül eliminiert wird, hängt u.a. von der Größe dieses Substituenten ab, denn je größer der abgespaltene Rest ist, desto stärker wird die Eliminierung dieses Substituenten auf Grund von sterischer Entspannung und damit verbunden von Entropiegewinn begünstigt. Auch die Stabilität der freigesetzten Abgangsgruppen kann einen Einfluss auf die Eliminierungstendenz haben, allerdings sollte die Stabilität von glycosidischem Rest und Aminosäure unter den gewählten Reaktionsbedingungen vergleichbar sein.

Einen anderen begünstigenden Faktor stellen die stereo-elektronischen Verhältnisse im Molekül dar. Für eine „glatte“ Eliminierung wirkt es sich günstig aus, wenn die π -Orbitale der Atome, die an der Eliminierungsreaktion beteiligt sind, parallel ausgerichtet sind und die π -Bindung somit durch ihre Überlappung unmittelbar entstehen kann (Organikum, 1990). Dafür ist eine Planarität der an der vinyllogenen β -Eliminierung beteiligten Bindungen notwendig bzw. besonders vorteilhaft. Durch *molecular modelling* des Oligosaccharidmoleküls mit 2,3-Endiolstruktur lässt sich der Torsionswinkel innerhalb dieser Struktur berechnen und dadurch eine Aussage darüber treffen, welche Eliminierung nach stereo-elektronischen Gesichtspunkten bevorzugt sein könnte (Abb. 41).

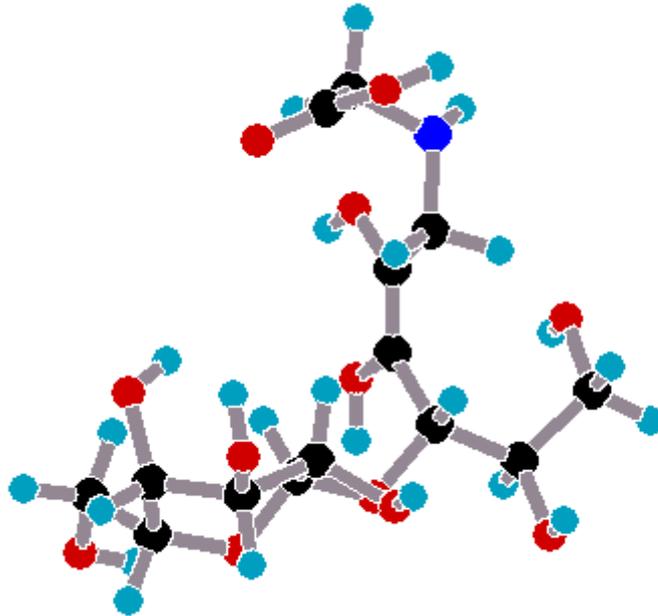


Abb. 41 Energieminimierte Konfiguration der 2,3-Endiolstruktur des Maltose-Glycin-Adduktes (Alchemy III, Tripos Associates)

Da die Struktur eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C2 und C3 enthält, sollten die Substituenten nicht wesentlich aus der Ebene herausgedreht sein. In der Tat bilden die Kohlenstoffatome C1 bis C4 beinahe eine perfekte Ebene, die beteiligten Hydroxylgruppen sind an C2 um 1° und an C3 um $2,9^\circ$ aus der Ebene herausgedreht. Da es sich aber um ein offenkettiges Molekül handelt, sollten diese kleinen Werte eine untergeordnete Rolle spielen. Somit kann, vom stereo-elektronischen Standpunkt aus betrachtet, die Eliminierungsreaktion an C1 oder C4 gleichberechtigt ablaufen. Allerdings ist der glycosidische Rest an C4 wesentlich voluminöser als die Aminosäure an C1. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Abspaltung an C4 bevorzugt abläuft und dieser Trend mit steigendem Polymerisierungsgrad noch stärker wird, da mit wachsender Größe des Substituenten die Eliminierungstendenz zunimmt.

Für den allgemeinen Mechanismus des „Peeling Off“ am reduzierenden Ende von Oligosacchariden lässt sich folgender Ablauf formulieren (Abb. 42):

Ein Oligosaccharid 31 reagiert unter Kondensation (a) mit einer Aminkomponente. Durch den nucleophilen Angriff des Elektronenpaares vom Stickstoff am Carbonyl-Kohlenstoff entsteht unter Wasserabspaltung eine Schiff'sche Base 32, die nun in der Lage ist, durch Keto-Enol-Tautomerisierung (b) das

Schlüsselintermediat für die vinyloge β -Eliminierung, nämlich das 2,3-Endiol 33, zu bilden.

Nun kann durch vinyloge β -Eliminierung (c) die Aminogruppe an C1 abgespalten werden. Durch reduzierende Reaktionen wie z. B. den Strecker-Abbau (d), aber auch durch Reaktionen mit anderen Endiolen (Huyghues-Despointes und Yaylayan, 1996), wird die entstandene tautomere Dicarbonylfunktion 34 wieder in das Endiol 35 überführt. Erneute vinyloge β -Eliminierung (e) resultiert nun in der Bildung der 1,4-Didesoxyhexosulose 28 und eines um eine D-Glucoseeinheit verkürzten Oligosaccharids 36.

Es ist aber auch möglich, dass das Endiol 33 über die vinyloge β -Eliminierung (f) zuerst den glycosidischen Rest an C4 abspaltet und die tautomere 1-Amino-1,4-Didesoxyhexosulose 37 bildet. Allerdings konnte keines der gefundenen Chinoxaline als das stabile Derivat der 1-Amino-1,4-Didesoxyhexosulose identifiziert werden. Ein analoger Reaktionsablauf zu dem oben beschriebenen (g, h) könnte auch hier zu der 1,4-Didesoxyhexosulose führen.

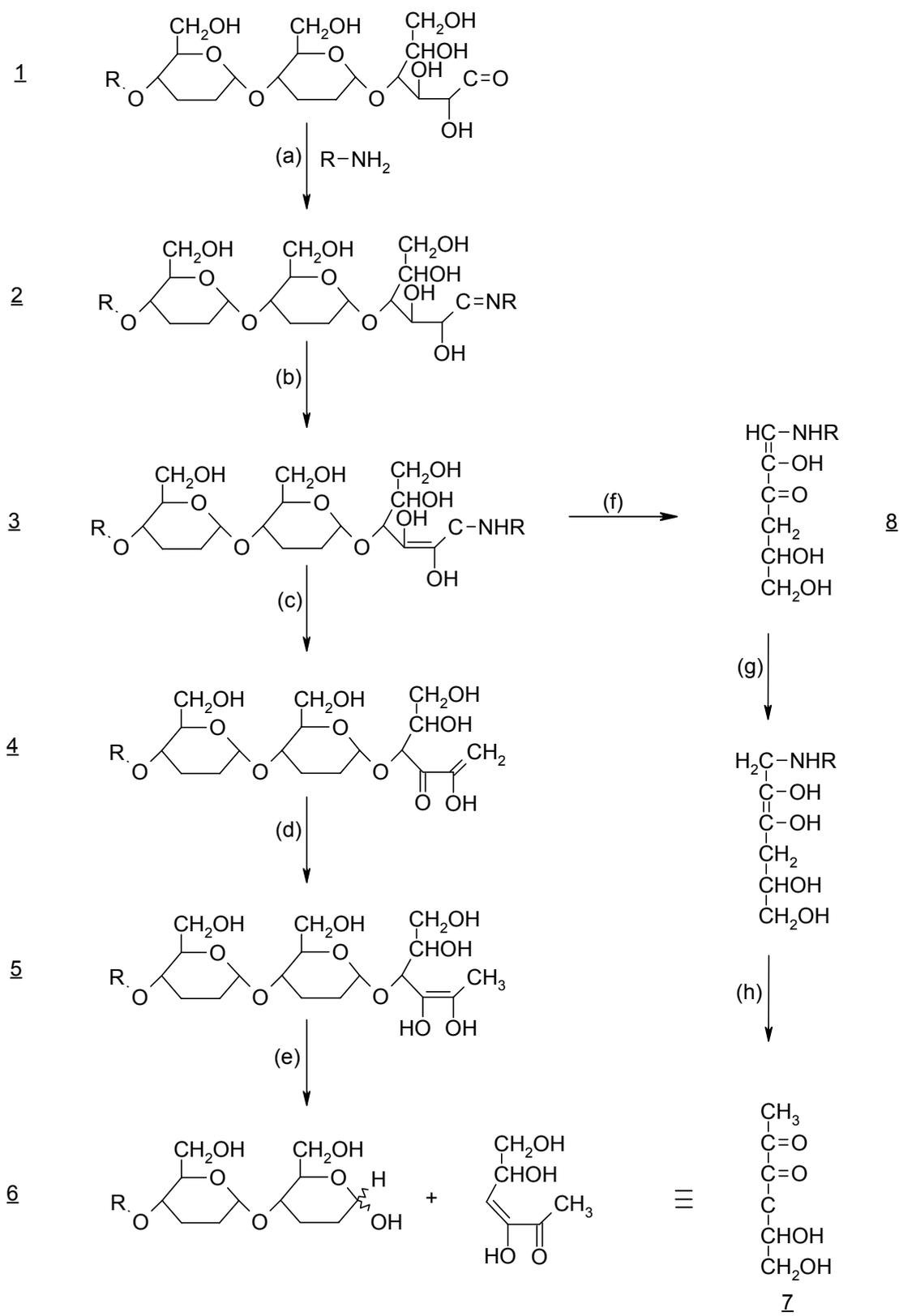


Abb. 42 Schematischer Reaktionsmechanismus für die Bildung der 1,4-Di-desoxyhexosulose in der Maillard-Reaktion aus Oligosacchariden im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu

4.4 Furosin, seine Bedeutung und Analytik

Furosin wurde zuerst in Hydrolysaten von überhitztem Milchpulver gefunden und entsteht nach der Reaktion von reduzierenden Sacchariden, wie z. B. Lactose, mit lysinhaltigen Proteinen im Ergebnis der sauren Hydrolyse des entsprechenden Amadoriproduktes (Belitz und Grosch, 1992). Dabei wird der glycosidische Rest an C4 des Amadoriproduktes von Lactose oder anderen 1→4-verknüpften Glycanen parallel zu der in 4.3. beschriebenen vinylogenen β-Eliminierung abgespalten. Das Produkt dieser Eliminierung ist eine 1-Lysino-1,4-Didesoxyhexosulose, die nach anschließender Cyclisierung und Wasserabspaltung Furosin ergibt (Abb. 43).

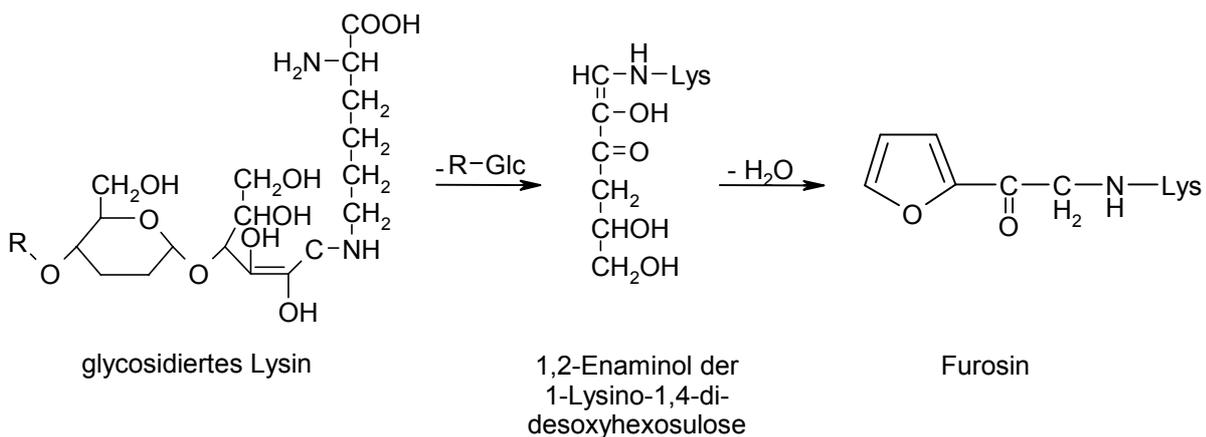


Abb. 43 Schematischer Reaktionsweg für die Bildung von Furosin aus glycosidiertem Lysin

Das Verhältnis aus Amadoriprodukt und gebildetem Furosin ist bei der sauren Hydrolyse der Proteine relativ unveränderlich, so dass durch die Furosinbestimmung z. B. der Lactosylierungsgrad von Casein oder allgemein der Glycosylierungsgrad von Proteinen bestimmt werden kann.

Daher lässt sich die Furosinmessung gut für die Qualitätsbestimmung von thermisch behandelten Lebensmitteln verwenden. Ein großer Vorteil von Furosin als Parameter ist, dass Rückschlüsse auf ein sehr frühes Intermediat der Maillard-Reaktion gezogen werden können. Damit stellt diese Methode also ein sehr empfindliches Instrument für die Untersuchung der Schädigung von

Proteinen in mild bis stark erhitzter Milch, aber auch in Käse oder Milchpulver dar (Resmini et al., 1990).

Bei Pasta kann mit Hilfe der Furosinbestimmung sogar festgestellt werden, welches Trocknungsverfahren bei der Herstellung angewendet wurde (Acquistucci et al., 1996).

In den letzten Jahren wurde von Resmini und Pellegrino (1991) eine relativ leicht durchzuführende Analysenmethode für die Furosinbestimmung entwickelt, die mittlerweile in vielen Ländern zur Standardmethode geworden ist.

Dabei handelt es sich um ein flüssigchromatographisches Verfahren. Nach einer sauren Hydrolyse wird die Probe mittels Festphasenflüssigextraktion gereinigt und nach flüssigchromatografischer Auftrennung bei 280 nm quantifiziert. Die HPLC nach dem Prinzip der Ionenpaar-Chromatographie wird an einer C₈-Umkehrphase durchgeführt.

Mit Hilfe einer externen Kalibriergeraden ist man nun in der Lage, den Furosingehalt des Lebensmittels genau zu bestimmen. Andere Reaktionsprodukte der Hydrolyse oder der nichtenzymatischen Bräunung stören dabei nicht.

4.5 Furosin in Maillard-Reaktionsmodellsystemen mit Maltose im Vergleich zu D-Glucose

Aus dem unter 4.4. beschriebenen Mechanismus für die Furosinbildung kann geschlussfolgert werden, dass der Furosingehalt im Reaktionsgemisch als Maß für die ablaufende vinyloge β -Eliminierung dienen kann. Furosin ist nämlich ein Reaktionsprodukt der 1-Lysino-1,4-dideoxyhexosulose, so dass das Ausmaß der Bildung dieses Precursors großen Einfluss auf die Menge an gebildetem Furosin haben sollte.

Mono- und Oligosaccharide sollten sich bezüglich ihrer Eliminierungstendenz und der möglichen Abreaktionswege unterscheiden.

In einem Modell wird Maltose bzw. D-Glucose mit ¹⁵N-boc-Lysin umgesetzt. Mit der boc-Schutzgruppe kann im vorliegenden Modell die Blockierung der α -Aminogruppe durch die Peptidbindung simuliert und zugleich die Furosinbildung forciert werden. Sie ist eine der meist gebrauchten Amino-Schutzgruppen, inert gegen katalytische Hydrierung und stabil im neutralen und alkalischen Reaktionsmilieu. Ein weiterer Vorteil der boc-Schutzgruppe ist ihre leichte Abspaltbarkeit im sauren Milieu (Kociensky, 1994).

Da mit der Analyse des Furosins eine saure Hydrolyse unter recht drastischen Bedingungen verbunden ist, entsteht für die HPLC-Untersuchung freies Furosin, das sich problemlos mit Hilfe des kommerziellen Referenzmaterials quantifizieren lässt.

Die Modellreaktionen werden bei 120 °C durchgeführt, einer Temperatur, bei der Maltose Monohydrat schmilzt (F_p 121 °C), so dass die Saccharidmoleküle sehr beweglich sind und sehr schnell reagieren können. Da D-Glucose bei der gewählten Temperatur noch nicht schmilzt und somit die Reaktionsgeschwindigkeit niedriger ist, werden nicht Proben gleicher Reaktionszeitintervalle miteinander verglichen, sondern jene mit vergleichbarer Bräunungsintensität. So erreicht z. B. Maltose/boc-Lysin-Gemisch nach 15 min eine korrigierte Absorption ($\lambda = 420$ nm) von 4,94 und das D-Glucose-Reaktionsgemisch weist nach 30 min eine Absorption von 3,96 auf. Im weiteren Reaktionsverlauf nimmt die Bräunung im Reaktionsgemisch der Maltose wesentlich stärker zu als bei D-Glucose.

Die Furosinkonzentrationen unterscheiden sich trotz des vergleichbaren Bräunungsgrades sehr stark. Aus Maltose entstehen 5,56 mmol/l Furosin (Ausgangskonzentration des Saccharids 0,1 M), während aus D-Glucose nur 0,17 mmol/l des Analyten gebildet werden.

Offensichtlich wird für Maltose die Bildung von Furosin und folglich auch von 1-Amino-1,4-dideoxyhexosulose stark bevorzugt. Das kann als ein weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass bei Disacchariden oder allgemein glycosidisch verknüpften Sacchariden der Abbau des Kohlenhydrats und die Bildung von Hexosulosen hauptsächlich über die vinyloge β -Eliminierung des glycosidischen Restes verlaufen. Im Gegensatz zum Monosaccharid, bei dem 1-Desoxyhexosulose, 3-Desoxyhexosulose oder 1-Amino-1,4-Dideoxyhexosulose relativ unbehindert und gleichberechtigt aus dem Amadoriprodukt gebildet werden können, ist beim Amadoriprodukt des Disaccharides der Weg zur 1-Desoxyhexosulose und 3-Desoxyhexosulose blockiert und nur die Abspaltung des glycosidischen Restes an C4 führt zur Bildung von Hexosulosen.

Somit kann die verstärkte Bildung von Furosin im Reaktionsgemisch Maltose/boc-Lysin als weiterer Beleg für die wichtige Rolle des „Peeling Off“-Mechanismus beim Abbau des Disaccharides während der Maillard-Reaktion gewertet werden.

4.6 Weitere mögliche Folgeprodukte der 1,4-Didesoxyhexosulose

In der Literatur wurden bereits verschiedene Reaktionsprodukte der 1,4-Didesoxyhexosulose beschrieben (s. 1.1.5.). Diese sollten dann bevorzugt entstehen, wenn Oligo- und Polysaccharide die Maillard-Reaktion durchlaufen. Hierbei dürfte die Art der verwendeten Aminokomponente ebenfalls eine wichtige Rolle spielen. Sekundäre Amine sind so z. B. nicht in der Lage, Schiff'sche Basen zu bilden. Deshalb kann es aus der 1,2-Enaminolstruktur nicht zur vinylogenen β -Eliminierung kommen. Statt dessen verläuft die Reaktion verstärkt über das 2,3-Endiol und somit verstärkt in Richtung 1-Desoxyhexosulose oder 1-Amino-1,4-Didesoxyhexosulose. Die Größe der jeweiligen Substituenten (Aminokomponente oder evtl. glycosidischer Rest; s. auch 4.3.) bestimmt nun, welches der beiden Eliminierungsprodukte überwiegt (Huber und Ledl, 1990).

Das direkte Cyclisierungsprodukt der 1,4-Didesoxyhexosulose ist das Acetylfuran, das in der flüchtigen Fraktion von Maillard-Reaktionsgemischen oligomerer Kohlenhydrate nachgewiesen werden konnte (Kim, 1994).

Weiterhin konnten Nedvidek et al. (1992) ein Furanonderivat nachweisen, das sie ebenfalls der 1,4-Didesoxyhexosulose als Precursor zuordnen. In ihrer Studie weisen die Autoren die Bedeutung des Strecker-Abbaus bei der Entstehung der 1,4-Didesoxyhexosulose nach. Da bereits beim ersten Eliminierungsschritt eine (enolisierte) α -Dicarbonylstruktur entsteht, muss diese Struktur wieder in die Endiolform überführt werden, bevor die zweite Eliminierungsreaktion stattfinden kann (s. auch 4.3.). In Reaktionsgemischen von β -Alanin ist viel weniger Furanon (5-Hydroxymethyl-2-methyl-3(2H)-furanons) enthalten als in Reaktionsgemischen mit α -Alanin, das im Gegensatz zu ersterem Strecker-aktiv ist.

4.7 Reaktionen von Fructosglycin im quasi Wasserfreien in Anwesenheit von OPD

Um die Rolle des Amadoriproduktes bei der Bildung von α -Dicarbonylen besser bewerten zu können, wird auch Fructosglycin, das Produkt der Amadori-Umlagerung aus D-Glucose und Glycin, mit OPD unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen umgesetzt. Die Umsetzungen werden genauso wie die Maillard-Reaktionsgemische von D-Glucose behandelt, allerdings mit geringeren

Ansatzgrößen (s. 9.3.5.). In den Proben wird die Bildung der Chinoxaline und die Abnahme des Fructosglycins gemessen.

4.7.1 Bildung von α -Dicarbynylen

Da das Amadoriprodukt in der Literatur als der direkte Vorläufer der Desoxyhexosulosen beschrieben wird, sollten gerade aus Fructosglycin große Mengen an α -Dicarbynylen zu erwarten sein. Insgesamt fällt jedoch auf, dass innerhalb des untersuchten Reaktionszeitraums nur relativ wenig α -Dicarbynyle gebildet werden.

3-Desoxyhexosulose ist die Desoxyhexosulose in der höchsten Konzentration. Nach 240 min Reaktionszeit erreicht sie die Konzentration von annähernd 3 mol% (Abb. 44). Im Laufe der Reaktion nimmt die Menge an 3-Desoxyhexosulose kontinuierlich zu. Anscheinend reagiert die Amadoriverbindung relativ träge zur 3-Desoxyhexosulose.

Das Gleiche gilt für die Bildung von *1-Desoxyhexosulose*. Nach 240 min werden 1,8 mol% im Reaktionsgemisch nachgewiesen. Nach der Hälfte der Reaktionszeit liegen 1,1 mol% des α -Dicarbynyls als Chinoxalin im Reaktionsgemisch vor (Abb. 44).

1,4-Didesoxyhexosulose ist wie die 1-Desoxyhexosulose ebenfalls ein Produkt der 2,3-Enolform des Amadoriproduktes. Am Ende der Reaktionszeit liegt sie mit 1,4 mol% in etwa gleichen Mengen wie 1-Desoxyhexosulose im Reaktionsgemisch vor (Abb. 44).

Diese relativ geringe Menge und die etwas verzögerte Bildung lassen sich durch das Fehlen einer freien α -Aminosäure erklären. Der für die Reduktion der (enolisierten) α -Dicarbynylfunktion wichtige Strecker-Abbau kann in diesem Fall erst ablaufen, wenn z. B. durch die Bildung von 1-Desoxyhexosulose oder 3-Desoxyhexosulose wieder Glycin aus dem Amadoriprodukt freigesetzt wurde.

Vergleicht man die Summe der Chinoxaline von 1-Desoxyhexosulose und 1,4-Didesoxyhexosulose mit der Menge an gebildetem Chinoxalin aus 3-Desoxyhexosulose, so fällt auf, dass die Enolisierungen zum 2,3-Endiol auf der einen und zum 1,2-Enaminol auf der anderen Seite in vergleichbaren Größenordnungen ablaufen. Über den gesamten Zeitraum der Reaktion liegt ein neutraler pH-Wert vor (gemessen nach dem Lösen), der auf die Anwesenheit von OPD zurückzuführen ist.

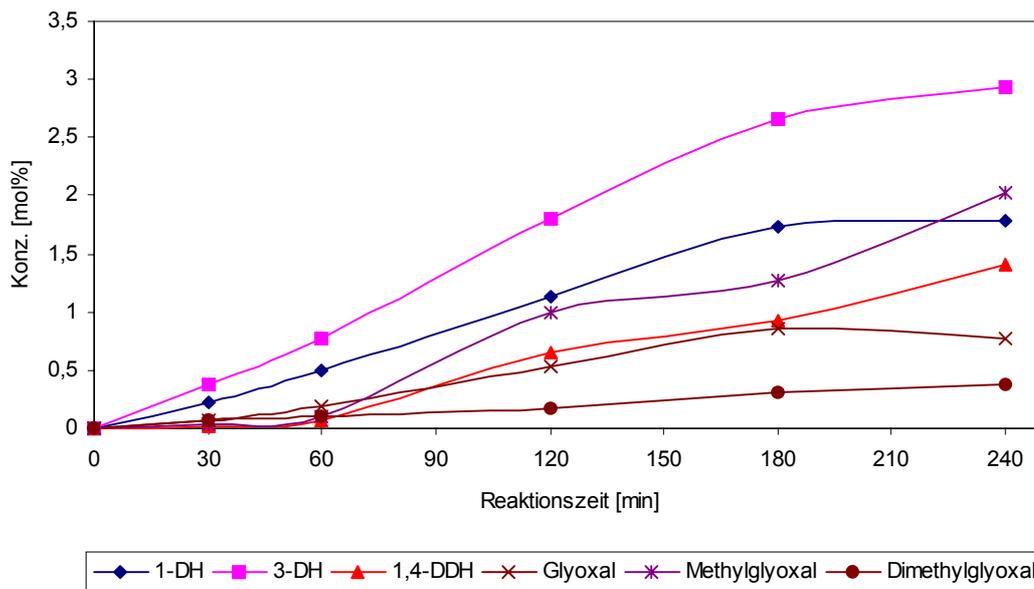


Abb. 44 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Fructosglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)

Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylfunktion werden ebenfalls nur in geringen Mengen im Reaktionsgemisch detektiert.

Selbst nach 240 min Reaktionszeit bleibt *Glyoxal* mit einem Anteil von 0,77 mol% bei einer nicht nennenswerten Konzentration.

Methylglyoxal wird zwar in einer etwas höheren Konzentration gebildet, am Ende der Reaktionszeit übersteigt es sogar die Konzentration von 1-Desoxyhexosulose. Allerdings wird mit 2,02 mol% wesentlich weniger detektiert als nach den Ergebnissen aus 3.2. und 4.1.1. erwartet werden könnte.

Für die Bildung von *Diacetyl* gilt das Gleiche wie für *Glyoxal*, auch seine Endkonzentration ist mit 0,39 mol% sehr gering.

Offensichtlich ist die Tendenz des Amadoriproduktes zur Fragmentierung relativ gering. Zum einen könnte dies am Fehlen von freier Aminosäure liegen, was eine Retro-Aldolreaktion des Zuckermoleküls erschweren könnte. Zum anderen wäre es aber auch möglich, dass die vinyloge β -Eliminierung bevorzugt abläuft. Die entstandenen Desoxyhexosulosen stünden dann nach der Abfangreaktion mit OPD nicht mehr für eine Fragmentierung zur Verfügung.

4.7.2 Abbau des Amadoriproduktes

Obwohl die α -Dicarbonyle, wie unter 4.7.1. ausgeführt, relativ langsam aus dem Amadoriprodukt gebildet werden, ist bereits nach 30 min der übergroße Teil an Fructosglycin abgebaut. Das Reaktionsgemisch enthält nur noch 5,9 mol% des Ausgangsstoffes, und nach 240 min sind mit 1 mol% nur noch Spuren des Amadoriproduktes detektierbar (Abb. 45)

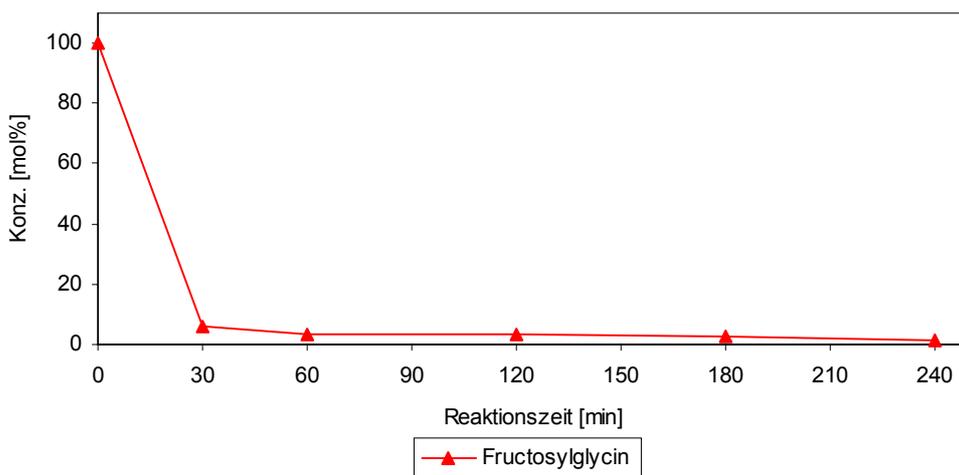


Abb. 45 Abbau von Fructosylglycin im quasi wasserfreien Milieu aus Fructosylglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)

Daraus kann geschlossen werden, dass das Amadoriprodukt sehr schnell abreagiert, die α -Dicarbonyle aber unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht zu den Hauptreaktionsprodukten zählen. Möglicherweise finden andere Reaktionen, wie z. B. Retro-Aldolreaktionen, Cyclisierungen und Dehydratisierungen, statt, die nicht zur Bildung von α -Dicarbonylen führen.

4.8 Vergleich der Amadoriprodukt- und α -Dicarbonylbildung in den Reaktionsgemischen D-Glucose/Glycin/OPD und Fructosylglycin/OPD

Bei der Reaktion von D-Glucose, Glycin und OPD wird schon nach 30 min das Amadoriprodukt in höchster Konzentration gemessen (8,9 mol%, s. 4.2.4). Im weiteren Verlauf der Reaktion verringert sich die Fructosylglycinkonzentration wieder, weil durch die Abnahme des Ausgangsstoffes D-Glucose die Abreaktion des Amadoriproduktes im Vergleich zu dessen Bildung überwiegt.

Vergleicht man nun die Reaktion von Fructosglycin allein mit dem Modellgemisch D-Glucose/Glycin in Anwesenheit von OPD bezüglich der gebildeten α -Dicarbonyle, so fallen einige Besonderheiten auf.

Wie unter 4.7.1. beschrieben, werden aus dem Amadoriprodukt sehr wenig α -Dicarbonyle gebildet. Zusätzlich ist auch die Bildungsgeschwindigkeit der α -Dicarbonyle aus Fructosglycin geringer als aus D-Glucose, Glycin und OPD und das Produktspektrum ist verschoben.

Die Ausbeute an 3-Desoxyhexosulose ist in beiden Reaktionsgemischen vergleichbar. Allerdings werden während der Reaktion von D-Glucose und Glycin in Anwesenheit von OPD weniger als 10 mol% Amadoriprodukt detektiert.

Es müssen also im Maillard-Reaktionsgemisch der D-Glucose noch andere Precursoren vorliegen, die ebenfalls zur 3-Desoxyhexosulose führen. Wahrscheinlich ist an dieser Stelle die Enaminolform der Schiff'schen Base ein wichtiges Intermediat. Diese Verbindung kann sofort die vinyloge β -Eliminierung durchlaufen und so die 3-Desoxyhexosulose bilden, noch bevor das Amadoriprodukt überhaupt entsteht.

Im Reaktionsgemisch Fructosglycin/OPD wird die 1-Desoxyhexosulose innerhalb der ersten drei Stunden in zweithöchster Konzentration nach 3-Desoxyhexosulose gebildet. Gleichwohl verläuft die Bildung relativ langsam und auch die gebildete Menge ist mit rund 1,5 mol% recht gering.

Eine vergleichbare Konzentration wird auch in der Reaktion von D-Glucose und Glycin in Anwesenheit von OPD erreicht, allerdings schon nach 60 min. Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt ihre Konzentration nur noch geringfügig zu. Auch für die 1-Desoxyhexosulose scheint deshalb das Amadoriprodukt nicht der alleinige Precursor zu sein.

Dasselbe gilt für Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur. Außer Methylglyoxal, das im späteren Reaktionsverlauf verstärkt gebildet wird, spielt die Entstehung der Zuckerfragmente in der Reaktion von Fructosglycin in Anwesenheit von OPD eine sehr untergeordnete Rolle, während im Zucker-Aminosäure-Modell die Methylglyoxalkonzentration noch die von 3-Desoxyhexosulose übertrifft.

In beiden Reaktionsgemischen liegt über den gesamten Zeitraum der Reaktion hinweg ein neutraler pH-Wert vor. Da die Richtung der Enolisierung pH-abhängig ist (s. auch 4.2.1.), liegt es nahe, das Verhältnis der α -Dicarbonyle, die jeweils

aus 1,2-Enaminolstrukturen oder 2,3 Endiolstrukturen gebildet werden, zu vergleichen.

Im Reaktionsgemisch aus D-Glucose, Glycin und OPD überwiegen die Produkte der 2,3-Endiolform (1,4-Didesoxyhexosulose und 1-Desoxyhexosulose), während das Verhältnis von Produkten der 1,2- und 2,3-Enolisierung bei der Thermolyse von Fructosglycin in Gegenwart von OPD eher ausgewogen ist. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Wahrscheinlichkeit der Enolisierung der C2-Carbonylgruppe in Richtung 1,2-Enaminol bzw. 2,3-Endiol im Amadoriprodukt gleich groß ist.

Bei der aminkatalysierten Reaktion von D-Glucose sollte allerdings gerade die 1,2-Enaminolform die wahrscheinlichere Konfiguration sein und im Ergebnis somit mehr 3-Desoxyhexosulose vorliegen. Eventuell hat die hohe Konzentration an frei verfügbarer Aminosäure einen maßgeblichen Einfluss auf die Verteilung der Reaktionsprodukte, weil das Glycin die Reaktion verstärkt in die Richtung der 1,4-Didesoxyhexosulosebildung führt.

5 Caramelisierung und Maillard-Reaktion im Wässrigen von D-Glucose, Maltose, Maltotriose und Fructosglycin in Anwesenheit von OPD

Ein wichtiger Parameter bei der nichtenzymatischen Bräunung ist die Wasseraktivität. Neben den Reaktionsmodellen für die thermische Behandlung von überwiegend trockenen Lebensmitteln sollen auch Modelle für die Caramelisierung und Maillard-Reaktion in Lebensmitteln mit hohem Wasseranteil untersucht werden. Das dafür verwendete Modell spiegelt Verarbeitungsprozesse wie z. B. das Pasteurisieren oder Sterilisieren von Milch und Säften oder allgemein das Kochen von Lebensmitteln wider.

5.1 Vergleich der Caramelisierung von D-Glucose, Maltose und Maltotriose im Wässrigen

Die verschiedenen Saccharide werden in Gegenwart von OPD, beide in 0,25 M Konzentration, in zugeschmolzenen Glasampullen bei 100 °C für unterschiedliche Reaktionszeiten erhitzt. Die Quantifizierung der α -Dicarbonylverbindungen im Reaktionsgemisch erfolgt anschließend wie auch schon bei 4. mittels HPLC, und ihre Identität wird zusätzlich mit Hilfe von Derivatisierung und anschließender

GC/MS abgesichert. Des Weiteren werden die Abnahme der Zuckerkonzentration, die Isomerisierung und die Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad untersucht.

5.1.1 Bildung von α -Dicarbonylen

In der wässrigen Lösung von D-Glucose und OPD (Glc/OPD) wird nach der Thermolyse nur ein Chinoxalin nachgewiesen.

Im Reaktionsgemisch ist ausschließlich *Glyoxal*, bzw. Chinoxalin, identifizierbar. Nach 240 min Reaktionszeit liegt es mit lediglich 0,6 mol% in der Lösung vor.

Glyoxal kann bei der Untersuchung des Caramelisierungsmodells von Maltose (Mal/OPD) am Ende der Reaktionszeit ebenfalls nur mit 0,3 mol% (nach 240 min, Abb. 46) nachgewiesen werden, auch *Methylglyoxal* wird während der Caramelisierung von Maltose gebildet, jedoch nur in Spuren.

Die erhaltenen HPLC-Chromatogramme deuten allerdings klar darauf hin, dass während der Caramelisierung von Maltose noch ein weiteres α -Dicarbonyl gebildet wird. Diese bisher noch nicht identifizierte Verbindung dominiert sogar die Chromatogramme der Thermolysate.

Die Retentionszeit dieses Chinoxalins, das sich aus einem bisher nicht identifizierten α -Dicarbonyl ableiten sollte, liegt zwischen den Retentionszeiten der Chinoxaline von 3- Desoxyhexosulose und 1,4- Didesoxyhexosulose.

Da die HPLC-Trennung an einer Umkehrphase vorgenommen wird, sollte also die Polarität des Chinoxalins des unbekanntes α -Dicarbonyls zwischen der Polarität der Chinoxaline von 3- Desoxyhexosulose (mit drei Hydroxylgruppen und einer Alkylgruppe) und der von 1,4- Didesoxyhexosulose (mit zwei Hydroxylgruppen und zwei Alkylgruppen) liegen.

Außerdem zeigt eine GC/MS-Analyse des Reaktionsgemisches, dass es sich bei dem gesuchten α -Dicarbonyl um ein Pentosederivat handeln muss.

Der Vergleich der spektrometrischen Daten (MS, NMR) und den verschiedenen chromatografischen Verfahren (HPLC, GC) mit den Daten einer unabhängig synthetisierten Referenzsubstanz bestätigt eindeutig die Vermutung, dass es sich bei dem unbekanntes α -Dicarbonyl um die 3-Desoxypentosulose handelt.

3-Desoxypentosulose (3-DP) liegt im Caramelisierungsgemisch von Maltose nach 240 min Reaktionszeit mit einer Konzentration von 0,63 mol% vor

(Abb. 46). Nach einer Induktionsphase verläuft seine Bildung nach 60 min mit einer relativ konstanten Geschwindigkeit.

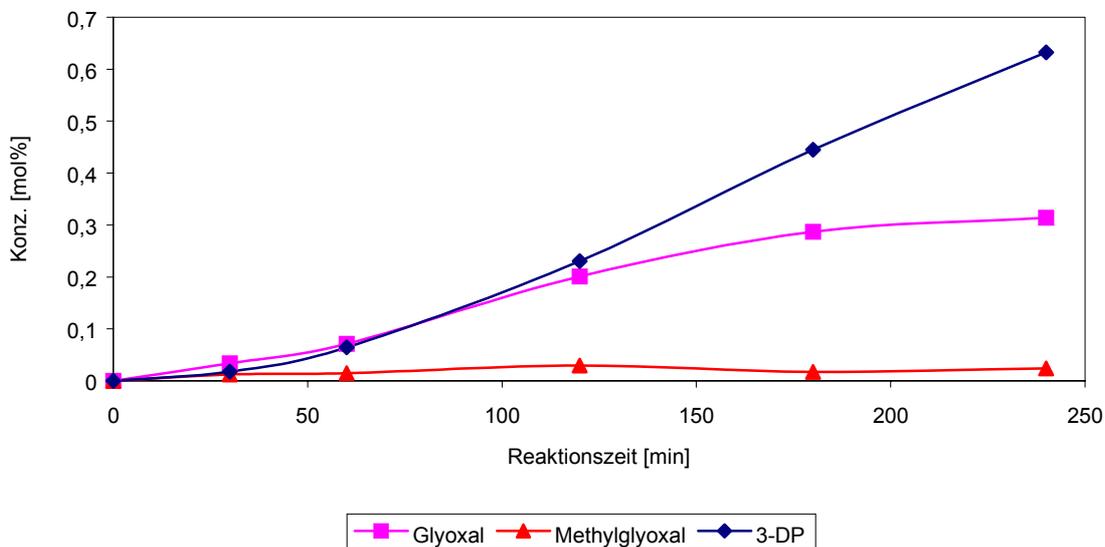


Abb. 46 Bildung von α -Dicarbylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/OPD

Eine ähnliche Beobachtung wie bei der Caramelisierung von Maltose wird auch bei der Umsetzung von Maltotriose gemacht.

Glyoxal wird auch hier lediglich in einer sehr geringen Menge gebildet (0,36 mol% nach 4 h).

Auch *3-Desoxypentosulose* entsteht nach 240 min im Reaktionsgemisch nur zu 0,52 mol%.

Beide α -Dicarbyle werden nach einer kurzen Induktionsphase mit gleichbleibender Geschwindigkeit geformt, wobei die Konzentrations-Zeit-Kurve für das Glyoxal etwas flacher verläuft als die der 3-Desoxypentosulose (ohne Abbildung).

5.1.2 Abbau der Kohlenhydratkomponente

Verglichen mit dem Abbau der Kohlenhydrate im trockenen Reaktionsmilieu verläuft die Abnahme der Saccharidkonzentration in wässriger Lösung eher langsam.

Im Caramelisierungsmodell für die D-Glucose (Glc/OPD) sind nach 30 min Reaktionszeit noch mehr als zwei Drittel der D-Glucose vorhanden. Im Verlauf

der vierstündigen Reaktion sinkt die Konzentration der D-Glucose auf 45 mol% ab (Tab. 03). Der Grund für die im Vergleich zum quasi wasserfreien Reaktionsmodell von D-Glucose langsamere Reaktion ist sicherlich in der hohen Verdünnung der Ausgangsstoffe in wässriger Lösung zu suchen.

Tab. 03 Abbau von D-Glucose (Glc), Maltose (Mal) und Maltotriose (M3ose) in wässriger Lösung (0,25 M) in Anwesenheit von OPD

Reaktionszeit [min]	0	30	60	120	180	240
mol% Glc in Glc/OPD	100	71	68	59	55	45
mol% Mal in Mal/OPD	100	67	57	53	43	34
mol% M3ose in M3ose/OPD	100	71	63	55	44	49

Dasselbe gilt für den thermischen Abbau von Maltose in wässriger Lösung in Gegenwart von OPD (Mal/OPD). Auch hier liegen nach 30 min Reaktionszeit noch über 60 mol% des Ausgangsstoffes in der Lösung vor (Tab. 03). Es ist allerdings bemerkenswert, dass am Ende der Reaktionszeit, wiederum 240 min, mit 34 mol% Maltose weniger Disaccharid im Reaktionsgemisch enthalten ist als Monosaccharid im identischen Experiment. An dieser Stelle erlangt eventuell die zusätzliche Möglichkeit der hydrolytischen Spaltung der glycosidischen Bindung im Maltosemolekül eine gewisse Bedeutung. So steht bei der Reaktion des Disaccharides mit der Hydrolyse ein weiterer Reaktionsweg offen, wodurch der Maltoseabbau verglichen mit dem der D-Glucose schneller erfolgt.

Der Abbau von Maltotriose (M3ose/OPD) unter diesen Reaktionsbedingungen ist jedoch wieder etwas langsamer. Wahrscheinlich ist die Reaktivität der glycosidischen OH-Gruppe entsprechend dem höheren Polymerisierungsgrad geringer. Die Abnahme der Maltotriosekonzentration verläuft mit ähnlicher Geschwindigkeit wie bei D-Glucose (Tab. 03). Nach Ablauf der untersuchten Reaktionszeit ist noch beinahe die Hälfte des Ausgangsstoffes im Reaktionsgemisch vorhanden.

5.1.3 Isomerisierung

Die Isomerisierung von Aldosen zu Ketosen kann in bestimmter Hinsicht zur Erhöhung der Reaktivität führen. So bildet D-Fructose z. B. unter Caramelisierungsbedingungen mehr HMF als D-Glucose (Glc/OPD) (Häseler, 2000), was auf den vorgebildeten Furanring in der Furanoseform der D-Fructose zurückzuführen ist (Ponder und Richards, 1993).

Im Caramelisierungsmodell der D-Glucose spielt die Umwandlung zur D-Fructose eine wichtige Rolle. Nach 180 min sind mehr als 10 mol% der Ketose entstanden (Abb. 47).

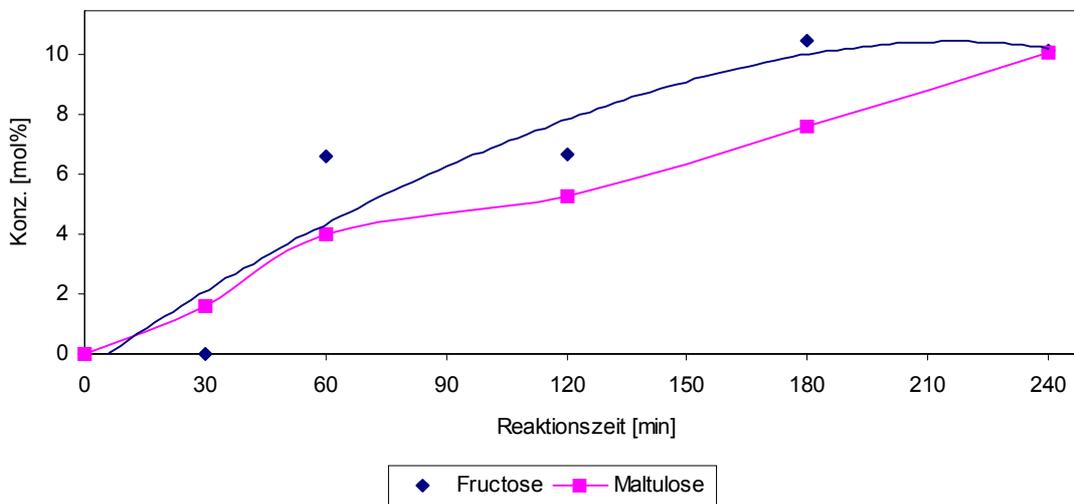


Abb. 47 Bildung von D-Fructose aus D-Glucose (Glc/OPD) und Maltulose aus Maltose (Mal/OPD) bei der Caramelisierung in wässriger Lösung

Wenn man berücksichtigt, dass die gefundene Konzentration nur die Summe aus Bildung und Abbau der D-Fructose darstellt und auch am Ende des beobachteten Zeitraums noch über 30 mol% der D-Glucose unverändert in der Lösung vorhanden sind, wird deutlich, dass die Isomerisierung bei der Caramelisierung von D-Glucose in wässriger Lösung von großer Bedeutung ist.

In der Caramelisierung von Maltose (Mal/OPD) wird eine vergleichbare Menge des entsprechenden Isomerisierungsproduktes Maltulose gebildet. Die Maltulosekonzentration steigt kontinuierlich über die gesamte Reaktionszeit hinweg und erreicht nach 240 min einen Wert von 10,1 mol% (Abb. 47). Die Zunahme der Maltulose verläuft beim Disaccharid etwas langsamer als beim Monosaccharid D-Glucose.

Die Bildung der entsprechenden Ketose aus Maltotriose kann mit Hilfe der HPTLC auf Grund des Fehlens von Vergleichssubstanzen nicht eindeutig bewiesen werden, ist aber durch theoretische Überlegungen zuordenbar. Eine quantitative Aussage lässt sich nicht treffen.

5.1.4 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad

Kohlenhydrate mit niedrigerem Polymerisierungsgrad als der Ausgangsstoff werden während der Caramelisierung in wässriger Lösung hauptsächlich auf dem Weg der hydrolytischen Spaltung gebildet.

Im Reaktionsgemisch von Maltose (Mal/OPD) werden nach der Reaktionszeit von 240 min 11,4 mol% D-Glucose nachgewiesen (Tab. 04). Zu einem geringen Teil entsteht die D-Glucose eventuell auch bei der Bildung von 3-Desoxypentosulose, die aber in der Caramelisierung von Maltose nur in sehr geringem Umfang abläuft.

Der Hauptanteil der D-Glucose entsteht unter diesen Reaktionsbedingungen durch die hydrolytische Spaltung der glycosidischen 1→4-Bindung im Maltosemolekül.

Tab. 04 Bildung von D-Glucose aus Maltose (Mal/OPD) und Maltose aus Maltotriose (M3ose/OPD) während der Caramelisierung in wässriger Lösung in mol%

Reaktionszeit [min]	0	30	60	120	180	240
D-Glucose aus Mal/OPD	0,84	7,58	7,83	9,34	11,22	11,41
Maltose aus M3ose/OPD	0,16		3,88	5,45	6,20	6,04

Da aus einem Molekül Maltose zwei Moleküle D-Glucose entstehen, werden also mindestens 5,7 mol% des Disaccharides durch hydrolytische Spaltung abgebaut. Außerdem kann D-Glucose innerhalb der Caramelisierung selbst weiterreagieren, so dass der tatsächliche Wert für die D-Glucosebildung aus Maltose sicher noch höher liegt.

Auch für die Maltotriose (M3ose) lässt sich eine ähnliche Entwicklung beobachten. Durch hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindung kommt es nach einer Reaktionszeit von 240 min zur Bildung von 6 mol% Maltose (Tab. 04). Aus einem Molekül des Trisaccharides kann jedoch nur ein Molekül Maltose

entstehen, so dass dieser Wert tatsächlich einem Maltotrioseabbau von mindestens 6 mol% entspricht.

Dementsprechend läuft sowohl in der Caramelisierung von Maltose als auch in der analogen Reaktion von Maltotriose die hydrolytische Spaltung des Kohlenhydrates in vergleichbarer Größenordnung ab.

5.2 Maillard-Reaktion im Wässrigen

Die Modellmischungen enthalten zur Simulation eines Maillard-Reaktionsgemisches äquimolare Mengen an Saccharid, Glycin und OPD. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen aus der Caramelisierung werden alle weiteren Reaktionsbedingungen beibehalten und die gleichen Reaktionsprodukte überwacht. Zusätzlich dazu kann das Ausmaß der Bildung des Amadoriproduktes Aufschluss über den Ablauf der Reaktion von Mono- und Oligosacchariden mit Glycin liefern.

5.2.1 Bildung von α -Dicarbynylen

Wie erwartet, findet die Bildung von α -Dicarbynylen in Gegenwart von Glycin verstärkt statt.

Im Maillard-Reaktionsgemisch der D-Glucose (Glc/Gly/OPD) werden neben Zuckerfragmenten mit α -Dicarbynylstruktur auch Hexosulosen bzw. deren Chinoxaline gefunden.

Die *Glyoxalkonzentration* steigt nach 240 min auf 1,6 mol%, und auch *Methylglyoxal* wird in der Maillard-Reaktion am Ende der untersuchten Reaktionszeit mit 1,2 mol% nachgewiesen (Abb. 48).

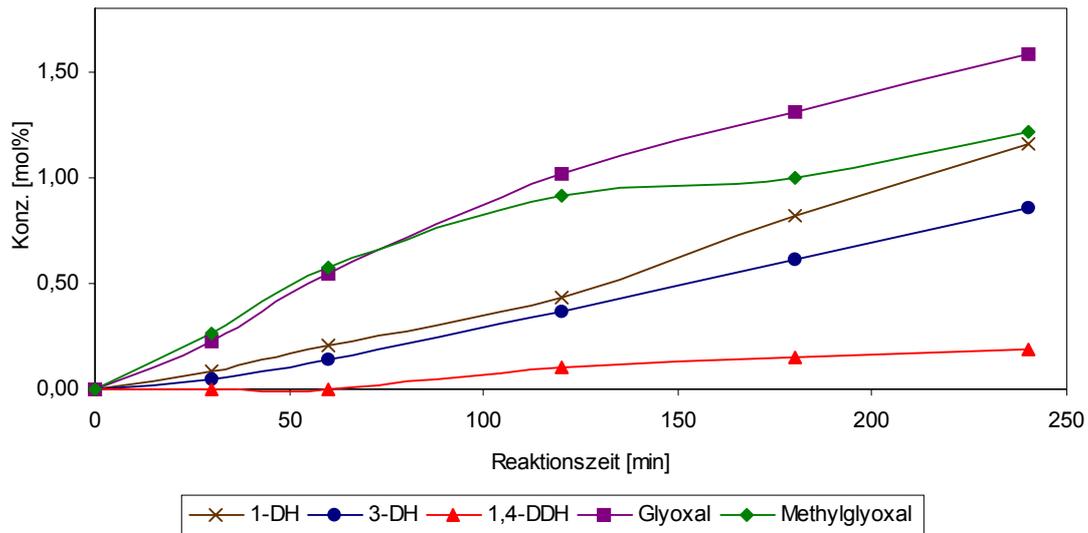


Abb. 48 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus D-Glucose/Glycin/OPD

Die Bildung von Glyoxal und Methylglyoxal verläuft innerhalb der ersten 60 min der Reaktionszeit etwas schneller. Danach flacht der Konzentrations-Zeit-Graph für die Chinoxaline beider Substanzen ab. Jedoch wird über die gesamte Reaktionszeit eine Zunahme dieser Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur beobachtet.

Unter Maillard-Reaktionsbedingungen können diese Verbindungen außer aus D-Glucose auch aus der Schiff'schen Base und der Enaminolform des Amadoriproduktes gebildet werden. Demgegenüber kann während der Caramelisierung nur die Retro-Aldolreaktion der D-Glucose selbst zur Bildung von Glyoxal und Methylglyoxal führen (s. 1.1.4. und 3.2.). Zusätzlich zu der erhöhten Anzahl der möglichen Ausgangsstoffe für die Fragmentbildung während der Maillard-Reaktion könnte die Retro-Aldolreaktion durch die katalytische Wirkung des Glycins als Base erleichtert ablaufen (Weenen, 1998).

Im Gegensatz zur kontinuierlichen Zunahme von Glyoxal und Methylglyoxal im hier beschriebenen Experiment erhielten Hofmann et al. (1999) ein anderes Ergebnis. Bei ihrem experimentellen Design wird das OPD erst nach Ablauf eines bestimmten Reaktionsintervalls zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Außerdem wird eine sehr hohe Konzentration an D-Glucose, OPD und in diesem Fall Alanin verwendet. Die Autoren beschreiben, dass die Konzentration von Glyoxal, abgefangen als Chinoxalin, zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Reaktion ein

Maximum durchläuft. Außerdem finden sie wesentlich niedrigere Konzentrationen an Chinoxalinen als mit der hier verwendeten Methode, bei der das Abfangreagens (OPD) über den gesamten Zeitraum hinweg im Reaktionsgemisch enthalten ist.

Wie schon erwähnt sind, anders als bei der Caramelisierung, im Maillard-Reaktionsgemisch D-Glucose/Glycin/OPD nun auch die Chinoxaline der Hexosulosen detektierbar.

1-Desoxyhexosulose wird nach 240 min Reaktionszeit mit 1,1 mol% im Reaktionsgemisch gemessen, während *3-Desoxyhexosulose* mit 0,9 mol% nach 240 min in einer etwas geringeren Menge vorhanden ist. Der pH-Wert der einzelnen Proben bleibt über die gesamte Reaktion hinweg neutral, was wahrscheinlich auf den Zusatz von OPD zurückzuführen ist.

Die von Hofmann et al. (1999) durchgeführten Untersuchungen am Reaktionsgemisch D-Glucose/Alanin in einer auf pH 7 gepufferten Lösung und mit nachträglicher Zugabe von OPD ergaben ein Verhältnis zwischen 3-Desoxyhexosulose zu 1-Desoxyhexosulose von 4:1.

Bei dieser Herangehensweise wird zwar der Einfluss des OPD auf die Maillard-Reaktion minimal gehalten, aber der unterschiedlichen Reaktivität der einzelnen α -Dicarbonyle wird wenig Rechnung getragen. Glomb und Pfahler (1999) waren erstmals in der Lage, 1-Desoxyhexosulose zu synthetisieren und fanden, dass 1-Desoxyhexosulose wesentlich reaktiver ist als 3-Desoxyhexosulose. Somit wird 1-Desoxyhexosulose wahrscheinlich wesentlich schneller wieder abgebaut als 3-Desoxyhexosulose.

Der Trend der in der vorgelegten Arbeit erhaltenen Ergebnisse wird durch die Veröffentlichungen von Nedvidek (1992a) und Feather et al. (1996) bestätigt. Ersterer fand, dass bei der Umsetzung von D-Glucose und Propylamin sowie von Fructosylpropylamin in Gegenwart von OPD in einer auf pH 7 gepufferten Lösung, dass 1-Desoxyhexosulose stärker als 3-Desoxyhexosulose gebildet wird. Feather et al. untersuchten die Bildung von Desoxyhexosulosen aus Fructosglycin, dem Amadoriprodukt von D-Glucose und Glycin, bei einem pH-Wert von 8,2 (pK_a der Substanz). Als Abfangreagenz wurde hier Aminoguanidin benutzt und es zeigte sich, dass bei den gebildeten Triazinderivaten von 1-Desoxyhexosulose und 3-Desoxyhexosulose das Triazin der 1-Desoxyhexosulose ebenfalls leicht überwog.

Weiterhin ist es interessant, die Anwendbarkeit des von Hofmann et al. (1999) vorgeschlagenen Bildungsweges von Glyoxal unter den hier gewählten Bedingungen zu überprüfen. Die Autoren postulieren die Bildung des Glyoxals aus Glucoson, das als Oxidationsprodukt der D-Glucose entstehen soll. Da für die Untersuchungen auch das Chinoxalin dieser Verbindung vorliegt und sich hervorragend flüssig- und gaschromatografisch nachweisen lässt, ist es möglich, auch die Bildung von Glucoson unter den hier gewählten Reaktionsbedingungen (verschlossene Ampulle) zu untersuchen. Im Reaktionsgemisch konnte allerdings kein Glucoson festgestellt werden. Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da die thermische Behandlung der Probe im geschlossenen System durchgeführt wurde und demzufolge relativ wenig Sauerstoff für mögliche Oxidationsreaktionen zur Verfügung stand. Deswegen kann der von Hoffmann et al. (1999) vorgeschlagene Mechanismus für die Bildung von Glyoxal über Glucoson nicht für die Glyoxalbildung in den hier untersuchten Proben übernommen werden. Demzufolge ist die Bildung von Glyoxal in den untersuchten Proben eher auf Retro-Aldolreaktion von Schiff'scher Base oder Enaminol zurückzuführen als auf die Fragmentierung von Glucoson.

Interessant ist auch, dass *1,4-Didesoxyhexosulose* in wässriger Lösung am Ende der Reaktionszeit, im Unterschied zum quasi wasserfreien Maillard-Reaktionsmodell, mit weniger als 0,2 mol% lediglich in Spuren festzustellen ist. Die Tatsache, dass nur sehr wenig *1,4-Didesoxyhexosulose* gebildet wird, lässt darauf schließen, dass der Strecker-Abbau oder andere reduzierende Reaktionen, die für die Bildung von *1,4-Didesoxyhexosulose* notwendig sind, in wässriger Lösung nicht bevorzugt ablaufen oder dass sie zumindest langsamer ablaufen als die Abfangreaktion mit OPD.

Insgesamt verläuft die Bildung der Hexosulosen in der frühen Phase der Reaktion eher träge und steigt erst nach 120 min leicht an. Im Vergleich dazu ist die Bildung der Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur von Anbeginn der Reaktion schnell.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Hofmann et al. (1999) überein.

Im Vergleich zu den Experimenten im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu (3.2.) ist die Ausbeute an Chinoxalinen bzw. α -Dicarbonylen unter wässrigen Bedingungen relativ gering. Dieser Effekt lässt sich höchstwahrscheinlich mit der

stärkeren Verdünnung der Ausgangsstoffe erklären. Außerdem ändert sich das Produktspektrum bezüglich der Art und Konzentration der einzelnen α -Dicarbonyle. Während im quasi wasserfreien Milieu hauptsächlich 1,4-Di-desoxyhexosulose, Methylglyoxal und 3-Desoxyhexosulose gebildet werden, entsteht in wässriger Lösung neben Methylglyoxal und 1-Desoxyhexosulose überwiegend Glyoxal.

Im Maillard-Reaktionsgemisch von Maltose, Glycin und OPD ist die Konzentration an 3-Desoxypentosulose mit 1,86 mol% nach 240 min Reaktionszeit (Abb. 49) wesentlich höher als unter Caramelisierungsbedingungen.

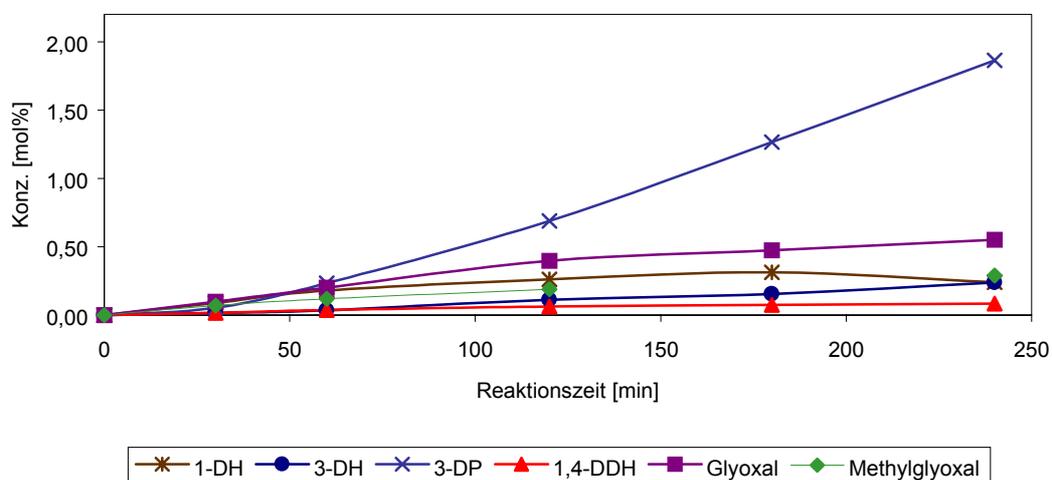


Abb. 49 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/Glycin/OPD

Die Form des Graphen lässt sogar vermuten, dass 3-Desoxypentosulose auch über den untersuchten Zeitraum hinaus gebildet wird. Selbst im letzten untersuchten Reaktionsintervall ist noch eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit (Anstieg der Kurve) zu verzeichnen. Alle anderen untersuchten α -Dicarbonyle werden in weitaus geringeren Konzentrationen als 3-Desoxypentosulose gebildet.

Die Konzentration von *Glyoxal* am Ende der beobachteten Reaktionszeit erreicht in Anwesenheit von Glycin einen Wert von 0,55 mol% (Abb. 49). Auch *Methylglyoxal* wird verstärkt gebildet, genauso wie *1-Desoxyhexosulose* und *3-Desoxyhexosulose* mit jeweils 0,24 mol% nach 240 min.

Für alle untersuchten α -Dicarbone außer 3-Desoxypentosulose bleibt die Bildungsgeschwindigkeit jedoch nach 120 min gleich bzw. nimmt leicht ab.

1,4-Didesoxyhexosulose spielt, anders als im quasi wasserfreien Maillard-Reaktionsmodell der Maltose (18 mol% nach 240 min Reaktionszeit, s. 4.2.1.), in wässriger Lösung keine bedeutende Rolle.

Diese Stelle nimmt unter den gewählten Reaktionsbedingungen die 3-Desoxypentosulose ein. Es kann vermutet werden, dass wie unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen auch hier der Hauptbildungsweg mit der Abspaltung des glycosidischen Rests am reduzierenden Ende beginnt. Die Tatsache, dass 3-Desoxypentosulose nicht aus D-Glucose gebildet wird, unterstreicht die Bedeutung der glycosidischen 1 \rightarrow 4-Bindung für die Bevorzugung dieses Reaktionsweges und für die Blockierung der Bildung anderer α -Dicarbone.

Auch im Maillard-Reaktionsmodell der Maltotriose (Tab. 05) findet eine verstärkte Produktion des α -Dicarbonyls 3-Desoxypentosulose (3-DP) statt. Nach 240 min enthält das Reaktionsgemisch 2,4 mol% dieser Substanz bzw. des Chinoxalins. Neben 3-Desoxypentosulose sind lediglich eine geringe Menge an Glyoxal (0,6 mol% nach 240 min) und Spuren von 1,4-Didesoxyhexosulose (1,4-DDH; 0,1 mol% nach 240 min) nachweisbar (Tab. 05).

Tab. 05 Bildung von α -Dicarbonylen (detektiert als Chinoxaline) in der Maillard-Reaktion von Maltotriose/Glycin/OPD in wässriger Lösung in mol%

Reaktionszeit [min]	30	60	120	180	240
3-DP	0.07	0.28	0.92	1.73	2.42
Glyoxal	0.09	0.18	0.45	0.52	0.59
1,4-DDH	0.02	0.05	0.09	0.11	0.11

Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung von 3-Desoxypentosulose in der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden in wässriger Lösung.

5.2.2 Abbau der Kohlenhydratkomponente

Die Anwesenheit von Glycin im Reaktionsgemisch beschleunigt den Abbau von D-Glucose. Nach 60 min Erhitzungszeit ist beinahe die Hälfte der D-Glucose umgewandelt. Nach 240 min enthält das Maillard-Reaktionsgemisch D-Glucose/Glycin/ OPD nur noch 35,7 mol% (Abb. 50)

Im Unterschied dazu sind bei der Caramelisierung nach 60 min Reaktionszeit noch über zwei Drittel des Monosaccharides vorhanden, am Ende der beobachteten Reaktionszeit liegen noch 44,9 mol% vor (s. 5.1.2.).

Der langsamere Abbau des Kohlenhydrats in wässriger Lösung, verglichen mit den Ergebnissen der quasi wasserfreien Reaktionsmodelle, kann der hohen Verdünnung der Ausgangsstoffe zugerechnet werden, was zu einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Diese Schlussfolgerung ist mit den relativ geringen Ausbeuten für die Chinoxaline und der geringen Menge an gebildetem Amadoriprodukt (s. 5.2.4.) in wässriger Lösung konsistent.

Der Abbau der Maltose wird nicht signifikant durch den Zusatz von Glycin beeinflusst. Die Abreaktion der Maltose verläuft in Gegenwart der Aminosäure in den ersten 60 min etwas schneller (es sind zu diesem Zeitpunkt noch 53,3 mol% vorhanden). Der Wert nach 240 min (33,7 mol%) unterscheidet sich jedoch nur geringfügig von dem der Caramelisierung (Abb. 50).

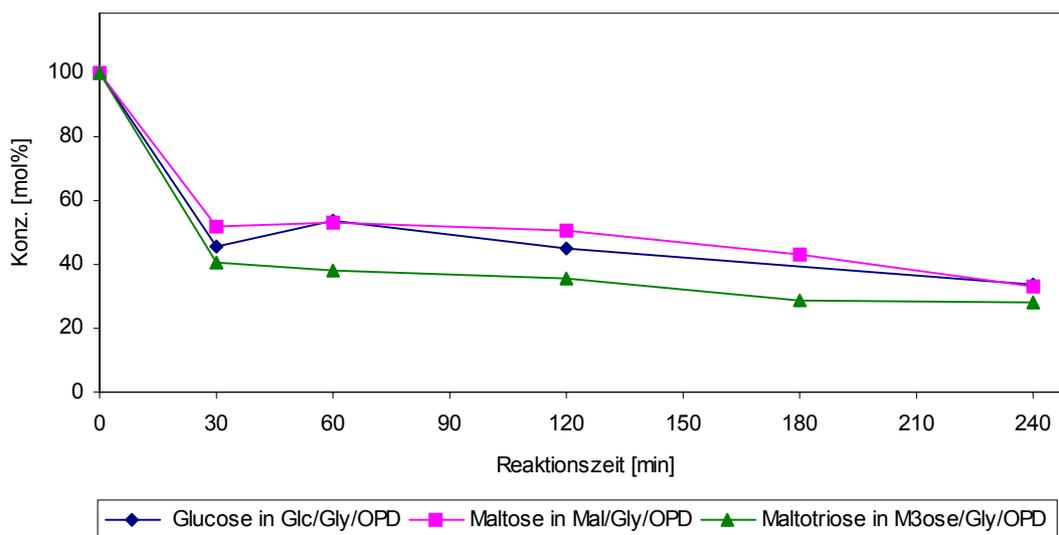


Abb. 50 Abnahme der Kohlenhydratkomponente in den Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD), Maltose (Mal/Gly/OPD) und Maltotriose (M3ose/Gly/OPD) in wässriger Lösung

Für die Maltotriose ist wieder eine stärkere Abnahme des Trisaccharides in der Maillard-Reaktion zu verzeichnen.

In Gegenwart von Glycin liegt die Menge des nach 30 min verbleibenden Trisaccharides bei 40,7 mol% (Abb. 50). Im weiteren Verlauf der Reaktion nimmt die Geschwindigkeit, mit der Maltotriose umgesetzt wird, ab. Nach 240 min sind noch 28,5 mol% Maltotriose im Maillard-Reaktionsgemisch enthalten. Der Unterschied zur Caramelisierung ist nach 30 min Reaktionszeit besonders deutlich. Im Caramelisierungsmodell liegen dann noch über 70 mol% der Maltotriose vor (Tab. 03).

Der Abbau des Trisaccharides weist einen ähnlichen Konzentrationsverlauf auf wie der von D-Glucose, obwohl man Monosacchariden eine höhere Reaktivität zuschreibt als Oligosacchariden. Offensichtlich spielt beim Abbau der Kohlenhydratkomponente in wässriger Lösung nicht nur die Reaktivität der glycosidischen OH-Gruppe eine Rolle. Auch die hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindungen im Oligosaccharid könnte einen erheblichen Anteil am Abbau von Maltotriose haben.

5.2.3 Isomerisierung

Die aus den Aldosen gebildeten korrespondierenden Ketosen lassen sich auch in den Maillard-Reaktionsmodellen nachweisen, allerdings ist ihre Konzentration geringer als in den entsprechenden Caramelisierungsmodellen.

Innerhalb der Maillard-Reaktion von D-Glucose wird erst nach 120 min D-Fructose mit 1 mol% detektiert. Am Ende der Reaktion steigt ihre Konzentration lediglich auf 2,1 mol% an. Höchstwahrscheinlich reduzieren konkurrierende Reaktionen der Aminosäure mit der glycosidischen OH-Gruppe die Bedeutung der Isomerisierung in der Maillard-Reaktion. Darüber hinaus könnte die gebildete D-Fructose in Gegenwart von Glycin schneller umgesetzt werden als bei der Caramelisierung und damit nicht mehr nachweisbar sein.

Auch in der Maillard-Reaktion von Maltose wird nur eine geringe Menge Maltulose gefunden. Zum ersten Mal wurde Maltulose nach 120 min mit 1,74 mol% detektiert, am Ende der Reaktionszeit waren es 2,57 mol%. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen bei der D-Glucose.

Anhand der HPTLC kann mit hoher Wahrscheinlichkeit bestätigt werden, dass während der Maillard-Reaktion auch aus Maltotriose die korrespondierende

Ketose gebildet wird. Allerdings sind ohne die Referenzsubstanz eine sichere Identifizierung und eine entsprechende Quantifizierung nicht möglich.

5.2.4 Bildung der Amadoriprodukte

Die Bildung von Fructosglycin im Maillard-Reaktionsmodell der D-Glucose verläuft in den ersten 60 min verhältnismäßig schnell (2,1 mol% nach 60 min, Abb. 51). In den darauffolgenden 120 min erhöht sich seine Konzentration nur noch geringfügig auf 3 mol% nach 240 min. Verglichen mit den Ergebnissen von 4.2.4., kann diese niedrige Konzentration wiederum auf die starke Verdünnung der Ausgangsstoffe zurückgeführt werden. Wenn man weiterhin berücksichtigt, dass das Amadoriprodukt gemeinsam mit der Schiff'schen Base und dem 1,2-Enaminol die Precursoren für die meisten α -Dicarbonyle darstellt, wird ersichtlich, warum in wässriger Lösung so wenige Chinoxaline bzw. α -Dicarbonyle nachgewiesen werden können.

Die Maillard-Reaktion von Maltose zu Maltulosglycin verläuft in ähnlicher Weise. Nach 30 min Reaktionszeit wird bereits eine Konzentration von 2,3 mol% des Amadoriproduktes erreicht (Abb. 51). In der zweiten Hälfte der Reaktionszeit verläuft der Abbau des Amadoriproduktes schneller als dessen Bildung. Nach einem Maximum von 3,4 mol% bei 120 min sinkt der Gehalt an Maltulosglycin nach 240 min auf 2,2 mol% ab.

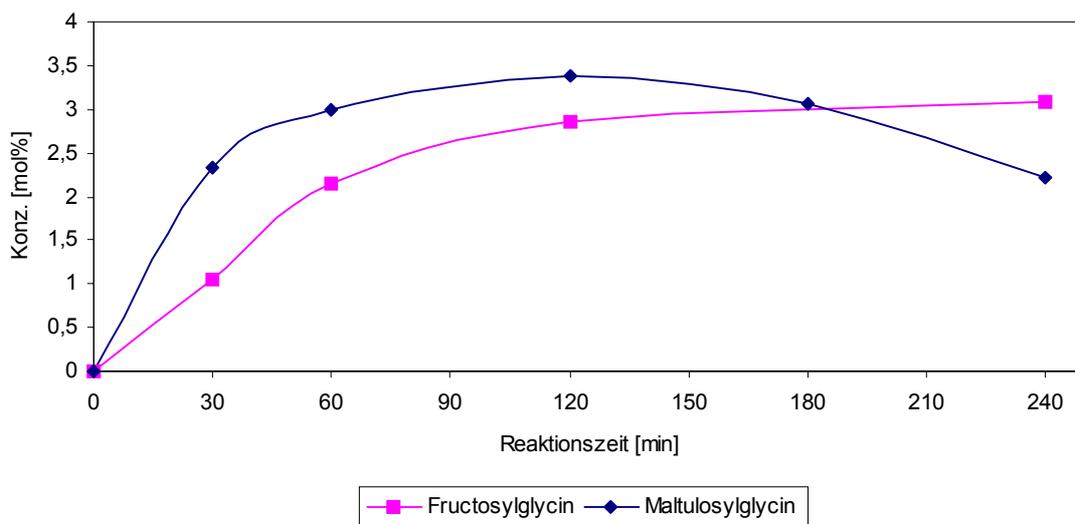


Abb. 51 Bildung von Fructosglycin und Maltulosglycin in Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD) bzw. Maltose (Mal/Gly/OPD) in wässriger Lösung

5.2.5 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad

Es ist interessant aufzuklären, inwieweit neben der hydrolytischen Spaltung im wässrigen Maillard-Reaktionsmodell noch andere Reaktionswege zur Spaltung der glycosidischen Bindung und damit zur Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad führen.

Während der Maillard-Reaktion von Maltose ist die Bildung von bis zu 10 mol% D-Glucose (nach 180 min, Tab. 06) detektierbar. Dieser Wert liegt zwar nicht über den Ergebnissen für die D-Glucosebildung während der Caramelisierung von Maltose, aber es können nun zusätzlich zur Hydrolyse der glycosidischen Bindung noch andere Reaktionen zur Bildung von D-Glucose führen.

So führt die vinyloge β -Eliminierung des glycosidischen Restes aus dem 2,3-En-diol des Amadoriproduktes der Maltose ebenfalls zur Bildung von D-Glucose. Jedoch wird nun im Unterschied zur hydrolytischen Spaltung aus 1 Mol Maltose lediglich 1 Mol D-Glucose gebildet. Die gefundene Konzentration an 3-Desoxy-pentosulose als weiterem Reaktionsprodukt dieser vinylogen β -Eliminierung und anschließender Retro-Claisen Esterkondensation (s. 5.3.) ist allerdings wesentlich geringer als die detektierte Konzentration an D-Glucose. Neben der Bildung von 3-Desoxypentosulose und Ameisensäure am reduzierenden Ende und der hydrolytischen Spaltung trägt auch die Bildung von Aminoreduktonen, wie von Pischetsrieder et al. (1998a) vorgeschlagen, zur Bildung von D-Glucose bei. Auch die Bildung des Aminoreduktons beinhaltet eine vinyloge β -Eliminierung und auch hier entsteht aus einem Molekül Maltose nur ein Molekül D-Glucose.

Durch die Reaktion mit Glycin im Sinne der Maillard-Reaktion wird die Konzentration an D-Glucose im Maillard-Reaktionsmodell sofort wieder reduziert. Man kann also bei gleicher Menge an D-Glucose davon ausgehen, dass infolge der Abspaltung von D-Glucose durch die Amino-Carbonyl-Reaktion der glycosidischen OH-Gruppe mehr Maltose unter Maillard-Reaktionsbedingungen abgebaut wird als während der Caramelisierung. Bei ähnlicher Abnahme der Maltosekonzentration wird bei der Caramelisierung ein kleinerer Teil des Ausgangsstoffes in D-Glucose umgewandelt als bei der Maillard-Reaktion. Dabei unterscheiden sich auch die bevorzugten Reaktionswege für deren Bildung.

Tab. 06 Entstehung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad in Maillard-Reaktionsgemischen von Maltose und Maltotriose in wässriger Lösung in mol%

Reaktionszeit [min]	0	30	60	120	180	240
D-Glucose aus Mal/Gly/OPD	0,84	5.41	7.39	9.60	10.01	9.68
Maltose aus M3ose/Gly/OPD	0,16	4,18	8,95	11,97	13,04	13,68

Die Untersuchungen des Maillard-Reaktionsmodells von Maltotriose bestätigen diese Annahme. Aus Maltotriose entstehen nach 240 min Reaktionszeit 13,68 mol% Maltose (Tab. 06), bei der Caramelisierung waren es 6,04 mol%. Diese starke Bildung von Disaccharid ist wiederum nicht ausschließlich auf die Entstehung von 3-Desoxypentosulose zurückführbar. Neben der hydrolytischen Spaltung der glycosidischen Bindung (vergleiche 5.1.4.) ist auch hier wieder der Abbau von Maltotriose durch Bildung von Aminoreduktonen, ausgehend vom reduzierenden Ende, in Erwägung zu ziehen (Abb. 52).

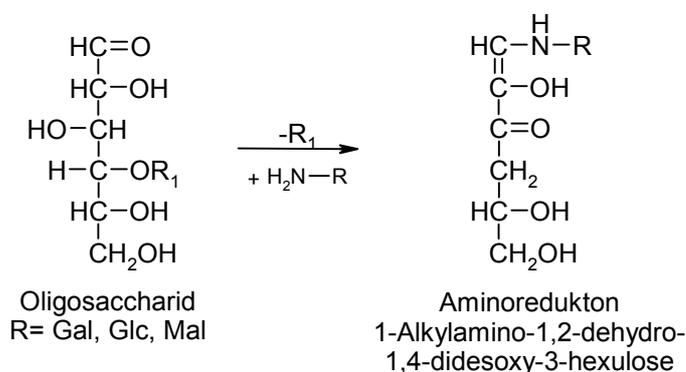


Abb. 52 Bildung eines Aminoreduktons aus Oligosacchariden nach Pischetsrieder et al., 1998b)

5.3 Vorschläge für die Bildung von 3-Desoxypentosulose

Es ist sinnvoll anzunehmen, dass bei der Entstehung der 3-Desoxypentosulose aus Oligosacchariden die D-Glucoseeinheit am reduzierenden Ende zwischen C1 und C2 gespalten wird. In diesem Fall wäre die Desoxyfunktion an C3 im 3-Desoxypentosulosemolekül der Ort der vormaligen glycosidischen 1→4-Bindung (Abb. 53 und 54).

Für die Abspaltung des C1 kommen verschiedene Mechanismen in Frage. Wichtige Aspekte bei deren Diskussion sind, dass die entstehenden Reaktionsprodukte sinnvoll in den Ablauf der Maillard-Reaktion passen und die ablaufenden Reaktionen unter den gegebenen Reaktionsbedingungen wahrscheinlich sein müssen.

Intramolekulare Basenkatalyse (Abb. 53; A):

Die Spaltung zwischen C1 und C2 könnte auf Grund des freien Elektronenpaares des an C1 gebundenen Stickstoffes durch eine intramolekulare Basenkatalyse ablaufen. Dieser Vorgang ist zu verschiedenen Zeitpunkten der Reaktion vorstellbar. So könnte z. B. schon die Schiff'sche Base des Di- oder Oligosaccharides auf diese Weise reagieren und eine Arabinoseeinheit am reduzierenden Ende hinterlassen. Die schon gebildete, aber noch an C3 glycosidierte Arabinose kann nun im Sinne der Maillard-Reaktion reagieren, wobei 1,2-Enaminolbildung und anschließende vinyloge β -Eliminierung zu 3-Desoxypentosulose führen würden. Das postulierte C1-Fragment ist in diesem Fall protoniertes Formamid, das hydrolytisch in Ameisensäure und Aminoverbindung gespalten wird.

Es ist auch möglich, dass erst der glycosidische Rest durch vinyloge β -Eliminierung aus dem 2,3-Endiol abgespalten wird. Nachfolgend kann dann wieder durch den an C1 gebundenen Stickstoff der Bruch der Bindung C1-C2 katalysiert werden, woraufhin direkt 3-Desoxypentosulose und ein C1-Fragment entstehen. Dieses C1-Fragment entspricht einer protonierten Imidsäure, die wiederum in wässriger Lösung zu Ameisensäure weiter reagieren könnte.

Schwachstellen innerhalb dieses vorgeschlagenen Mechanismus' sind, dass das Ausmaß und die Wirkung der intramolekularen Basenkatalyse schwer abzuschätzen sind. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung der C1-Fragmente unter Berücksichtigung ihrer Stabilität unbekannt.

Retro-Claisen Esterkondensation (Abb. 53; b, Abb. 54):

In einem weiteren, hier zu favorisierenden Reaktionsmechanismus für die Entstehung von 3-Desoxypentosulose wird die Spaltung an C1-C2 durch den Angriff eines Hydroxidions an C1 eingeleitet.

Ausgangspunkt für diesen Mechanismus wäre auch hier die Bildung der 1-Amino-1,4-Didesoxyhexosulose durch vinyloge β -Eliminierung aus der 2,3-En-diolstruktur, die in der frühen Phase der Maillard-Reaktion entsteht. Die Eliminierung des Saccharids wird durch die planare Anordnung der Bindungen von C1 bis C4 begünstigt. Eine nachfolgende Keto-Enol-Tautomerisierung führt zu einer 1-Imino-3-Keto-Struktur. In dieser Struktur kann nun der Angriff des Hydroxidions, das bei dem vorliegenden pH-Wert vom Reaktionsmilieu Wasser bereitgestellt wird, eine Abspaltung von C1 hervorrufen.

Diese Reaktion, die als Retro-Claisen Esterkondensation charakterisiert werden kann, resultiert in der Bildung eines Pentosederivates und Ameisensäure. Die entscheidende Rolle des Angriffs des Hydroxidions würde weiterhin erklären, warum diese Reaktion in der wässrigen Lösung dominiert.

Weenen und Apeldoorn (1996) beschreiben für die Bildung von Diacetyl einen ähnlichen Mechanismus, den sie β -Dicarbonylspaltung nennen (s. 1.1.4.).

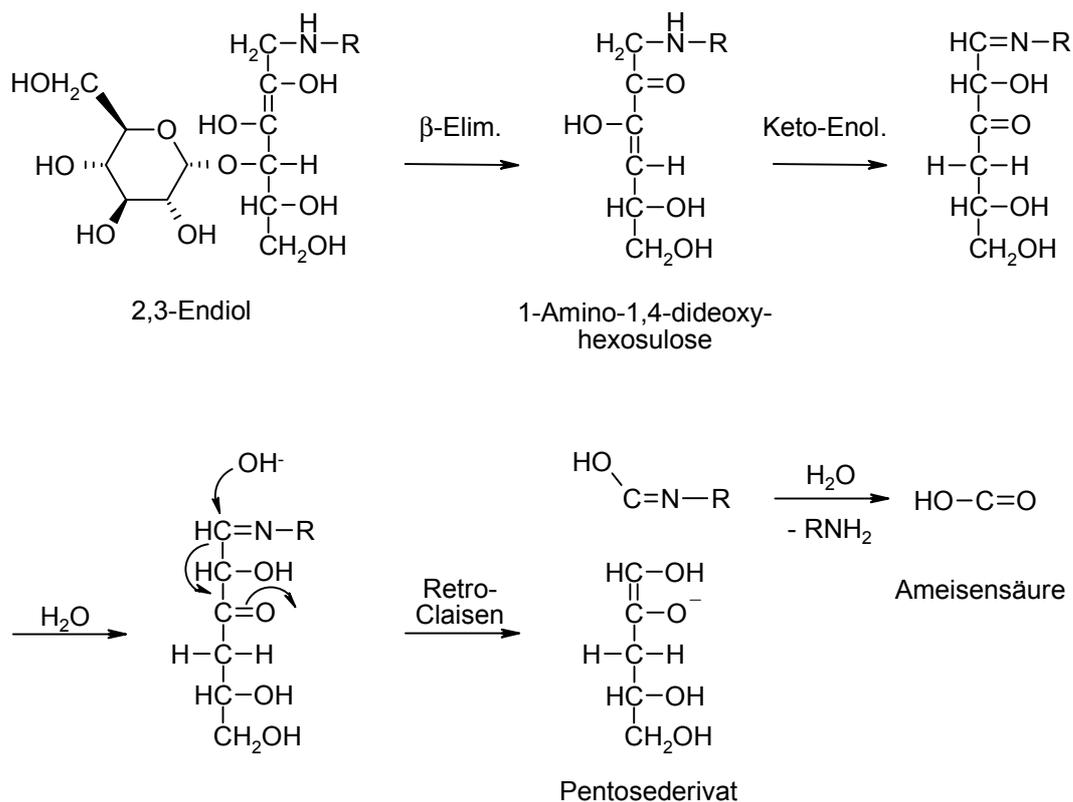


Abb. 54 Vorschlag für den Abbau von Maltose in der Maillard-Reaktion in wässriger Lösung (Abkürzungen s. Abb.53)

Reaktionen des Pentosederivates aus der Retro-Claisen Esterkondensation, die zur Bildung von 3-Desoxypentosulose führen, müssen eine Oxidation des Moleküls bewirken. Das kann entweder direkt mit Sauerstoff oder aber mit anderen Oxidationsmitteln geschehen.

Weenen (1998) schlägt mehrere Möglichkeiten für die Oxidation von Kohlenhydratderivaten während der Maillard-Reaktion vor (Abb. 55). So kann z. B. durch die Reaktion mit einem Elektrophil formal ein Hydridion übertragen werden, was zur Ausbildung der α -Dicarbonylfunktion führt. Ein anderer von ihm beschriebener Weg ist die Oxidation einer Endiolstruktur an einer zweiten α -Dicarbonylgruppe, was ebenfalls zum diskutierten Reaktionsprodukt führt.

Des Weiteren könnte durch die Anwesenheit von Sauerstoff und unter Abspaltung von H_2O_2 die 3-Desoxypentosulose gebildet werden (Weenen, persönliche Mitteilung, 1999, Abb. 52). Der letztere Oxidationsmechanismus ist allerdings unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ausgesprochen

unwahrscheinlich, da in der verschlossenen Ampulle nur eine begrenzte Menge Sauerstoff für eventuelle Reaktionen dieser Art zur Verfügung steht.

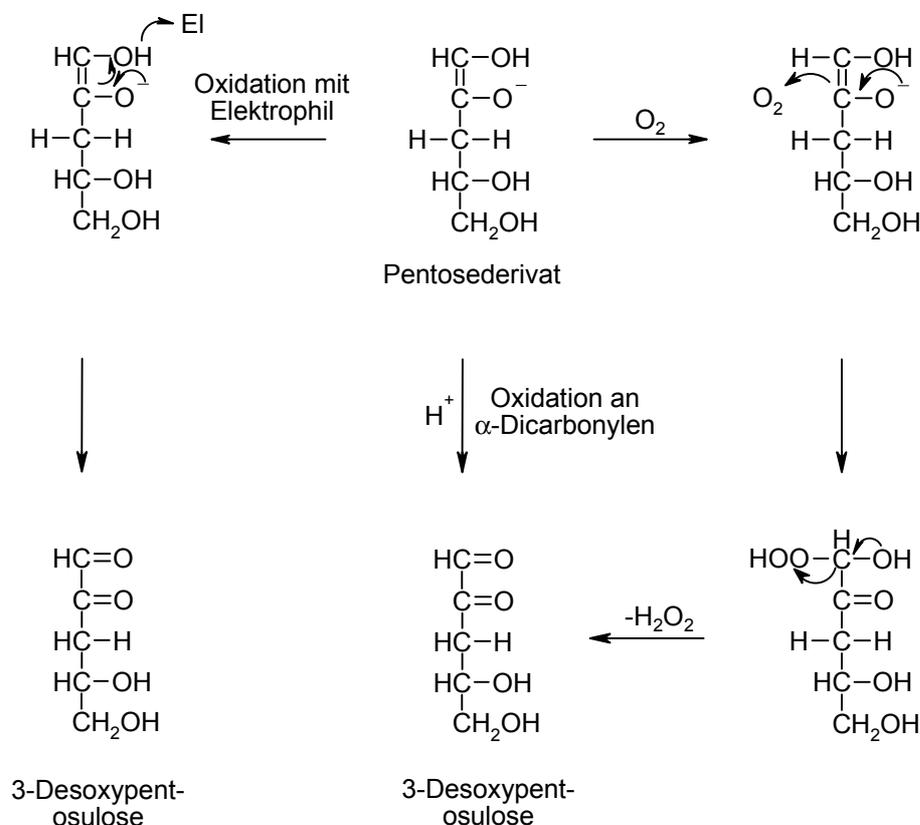


Abb. 55 Oxidation des Pentosederivates auf verschiedenen Wegen (Weenen, 1998 und Weenen persönliche Mitteilung, 1999)

Insgesamt ist der Reaktionsweg zu 3-Desoxypentosulose und Ameisensäure über Retro-Claisen Esterkondensation und Oxidation zu favorisieren. Beide Reaktionen können höchstwahrscheinlich unter den gegebenen Reaktionsbedingungen ablaufen. Des Weiteren sind aus den Produkten der Retro-Claisen Esterkondensation andere Intermediate der Maillard-Reaktion formulierbar, deren Anwesenheit im Maillard-Reaktionsgemisch als Hinweis auf die Richtigkeit des formulierten Mechanismus gewertet werden kann (s. 5.4.).

5.4 Das Pentosederivat als Intermediat in der Bildung bekannter Maillard-Reaktionsprodukte

Aus dem Pentosederivat ist neben der Bildung von 3-Desoxypentosulose, die z. B. in Abwesenheit von OPD durch Cyclisierung und Wasserabspaltung zu Furfural reagieren kann, die Bildung weiterer Reaktionsprodukte vorstellbar (Abb. 56).

Mögliche Produkte sind die 3-Desoxypentulose, ein Ketosederivat, und Furfurylalkohol. Beide Substanzen wurden bereits in anderen Modellreaktionen und sogar in Lebensmitteln (in beiden Fällen in thermisch behandelter Milch) nachgewiesen.

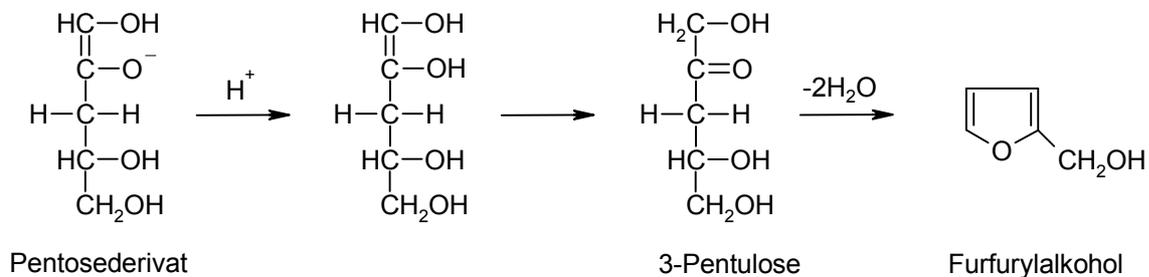


Abb. 56 Möglichkeiten der Bildung bekannter Maillard-Reaktionsprodukte aus einem Reaktionsprodukt der Retro-Claisen Esterkondensation

So publizierten z. B. Troyano et al. (1992) die Bildung von 3-Desoxypentulose in Milch und alkalischen Modellmischungen aus Maltose oder Cellobiose. Als zweites Reaktionsprodukt wird hier, wie unter 5.3., Ameisensäure vorgeschlagen.

Als ein anderes mögliches Reaktionsprodukt der weiteren Umwandlung des Pentosederivates wurde erstmalig von Patton (1950) Furfurylalkohol gefunden. Diese Substanz wurde ebenfalls sowohl in Milch als auch in neutralen und alkalischen Modellreaktionen mit Lactose und Lactose/Lysin nachgewiesen. Für seine Entstehung schlägt der Autor allerdings die Bildung der 3-Desoxyhexosulose am reduzierenden Ende der Maltose vor. Anschließende α -Dicarbonylsplaltung soll zwischen C1 und C2 zu einem galactosylierten Pentosederivat führen, das den glycosidischen Rest erst nach Ringschluss und Dehydratisierung eliminiert. Der Autor erachtet für diese Reaktion einen pH-Wert von 6-8 zu Beginn und von 4-6 im fortgeschrittenen Stadium der Reaktion für

notwendig. Diese Bedingung wird leicht durch die typische Zunahme der Protonenkonzentration bei der Maillard-Reaktion erfüllt.

5.5 Relevanz der 3-Desoxypentosulosebildung in der Maillard-Reaktion, ausgehend von Oligosacchariden in wässriger Lösung

Einige Wissenschaftler (Tressl et al. (1998)) sehen die Pentosen als die eigentlich reaktiven Saccharide innerhalb der Maillard-Reaktion an. Ihrer Meinung nach müssen größere Saccharide und Oligomere erst zu Pentosen reagieren, um signifikant an der Bräunung während der Maillard-Reaktion teilnehmen zu können.

Die hier dargestellten Untersuchungen zeigen, dass es auch andere wichtige reaktive Intermediate in der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden gibt. Die Bildung der 3-Desoxypentosulose könnte neben anderen Reaktionen während der Maillard-Reaktion eine Aktivierung der Oligosaccharide bewirken.

Der vorgeschlagene Mechanismus für die Bildung von 3-Desoxypentosulose erklärt außerdem die Entstehung von Ameisensäure. Sie macht einen großen Teil der innerhalb der Maillard-Reaktion gebildeten organischen Säuren aus und wurde bisher hauptsächlich als ein Produkt der α -Dicarbonylsplaltung angesehen. Da in letzter Zeit Zweifel an der Wahrscheinlichkeit und Relevanz der α -Dicarbonylsplaltung aufgekommen sind (Weenen, persönliche Mitteilung 1999), könnte die hier beschriebene Reaktion einen neuen, wahrscheinlicheren Bildungsweg für die Ameisensäure darstellen.

Unterstützt wird die These, dass sich Ameisensäure während des Abbaus von Oligosacchariden vom reduzierenden Ende abspaltet, durch Untersuchungen von van Boekel (1996). In seiner Arbeit über die Maillard-Reaktion während der thermischen Behandlung von Milch fand der Autor, dass in lactosehaltigen Reaktionsmodellen mehr Ameisensäure entsteht als in den korrespondierenden galactosehaltigen Proben. Er vermutet, dass auch hier die glycosidische Bindung in der Lactose eine wesentliche Rolle spielt und die Reaktion verstärkt auf den Weg der Ameisensäureproduktion lenkt.

Die genaue Kenntnis von Reaktionsabläufen kann der kinetischen Beschreibung der Maillard-Reaktion dienen und dadurch Vorhersagen über den Ablauf der Maillard-Reaktion erlauben.

5.6 Einordnung der beschriebenen Mechanismen in die Gesamtheit des Abbaus von Oligosacchariden

Die Bildung von 3-Desoxypentosulose vom reduzierenden Ende des Oligosaccharides spielt eine wichtige Rolle bei der Erklärung des breiten und ausgangsstoffspezifischen Produktspektrums in der Maillard-Reaktion von Sacchariden mit glycosidischer Bindung.

Der vorgeschlagene Mechanismus erklärt sowohl die Entstehung von verschiedenen Furanderivaten als auch von Ameisensäure. Unter den gegebenen Reaktionsbedingungen kann allerdings nur ein kleiner Teil des Abbaus der Oligosaccharide mit der Bildung von 3-Desoxypentosulose erklärt werden. Es ist zu erwarten, dass in wässriger Lösung die Hydrolyse der glycosidischen Bindung für den Abbau der Oligosaccharide zunehmende Bedeutung erlangt (s. 5.1.4., 5.2.5. sowie Kroh et al., 1996).

Des Weiteren sollte es aber noch andere für die Maillard-Reaktion spezifische Wege beim Abbau der glycosidischen Bindung geben, da sich mit dem oben genannten Mechanismus allein die Unterschiede in der Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisierungsgrad bei Caramelisierung und Maillard-Reaktion nicht erklären lassen.

Eine mögliche Erklärung für den gefundenen Unterschied könnte die Bildung von Aminoreduktionen sein, ebenfalls vom reduzierenden Ende her. Pischetsrieder et al. (1998a,b) fanden Aminoreduktone in wässrigen Reaktionsmodellen mit Lactose und Lysin und vermuten, dass es sich hierbei um das erste stabile Produkt der β -Eliminierung des glycosidischen Restes an C4 handelt.

Die Maillard-Reaktion von Oligosacchariden im Wässrigen beinhaltet also zum einen spezifische Reaktionen der Kohlenhydrate mit glycosidischer Bindung an deren reduzierendem Ende. Zum anderen wird aber auch durch die hydrolytische Spaltung der glycosidischen Bindungen D-Glucose produziert, die dann ebenfalls an der Maillard-Reaktion teilnimmt und zu eher monosaccharid-typischen Reaktionsprodukten führt.

5.7 Reaktionen von Fructosglycin im Wässrigen in Anwesenheit von OPD

Es wird erwartet, dass sich aus dem Vergleich der Modellsysteme D-Glucose/Glycin/OPD und Fructosglycin/OPD in wässriger Lösung Schlussfolgerungen

über den Stellenwert des Amadoriproduktes innerhalb der Maillard-Reaktion in wässriger Lösung ziehen lassen.

5.7.1 Bildung von α -Dicarbynylen

In wässriger Lösung werden aus dem Amadoriprodukt bedeutend mehr α -Dicarbynyle gebildet als bei der entsprechenden Reaktion unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen.

Die *1-Desoxyhexosulose* ist unter den gegebenen Reaktionsbedingungen (wässrige Lösung, neutraler pH-Wert durch Anwesenheit von OPD) (Abb. 57) das dominierende α -Dicarbynyl. Während ihre Bildung in den ersten 120 min der Reaktion mit einer konstanten Geschwindigkeit verläuft, flacht die Konzentrations-Zeit-Kurve im weiteren Reaktionsverlauf etwas ab. Die Konzentration des Chinoxalins der *1-Desoxyhexosulose* nimmt aber bis zum Ende des beobachteten Reaktionszeitraums weiter zu. Nach 240 min liegen 14 mol% in der Lösung vor. Wahrscheinlich ist die Bildung des α -Dicarbynyls zu diesem Zeitpunkt noch nicht abgeschlossen. Wie unter 5.7.2 gezeigt wird, sind noch über 40 mol% des Amadoriproduktes nicht umgesetzt.

3-Desoxyhexosulose wird ebenfalls in relativ großem Umfang gebildet. Die Produktion verläuft parallel zu der von *1-Desoxyhexosulose*, aber die gemessene Konzentration ist deutlich geringer (Abb. 57). Am Ende der beobachteten Reaktion liegt eine Konzentration von 8,82 mol% im Reaktionsgemisch vor.

1,4-Didesoxyhexosulose wird nur in Spuren mit maximal 0,28 mol% im Reaktionsgemisch nachgewiesen (Abb. 57), während *1-* und *3-Desoxyhexosulose* das Spektrum der untersuchten α -Dicarbynylverbindungen dominieren.

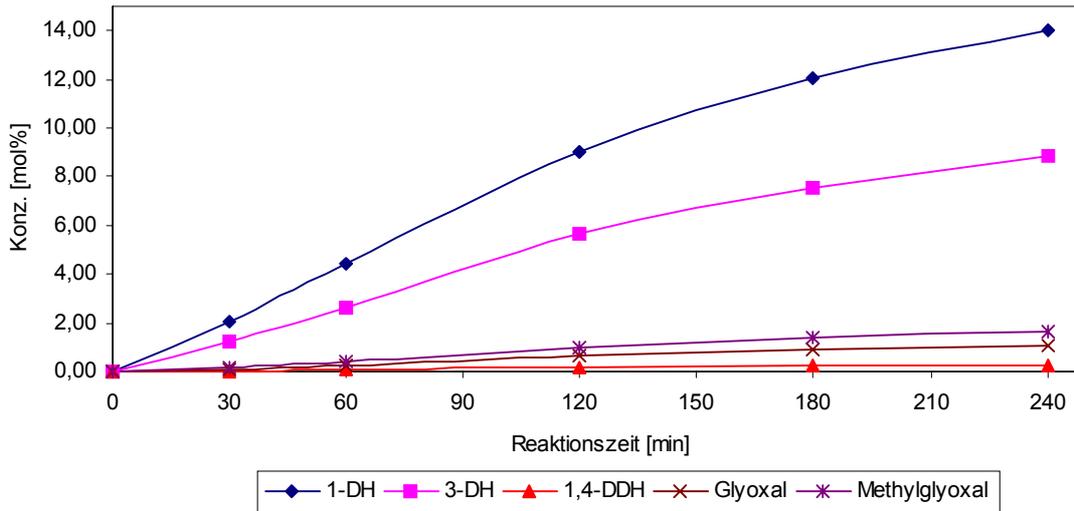


Abb. 57 Bildung von α -Dicarbylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in wässriger Lösung aus Fructosglycin/OPD (jeweils 0,25 M)

Zuckerfragmente mit α -Dicarbylfunktion werden ebenfalls nur in sehr geringen Mengen gebildet.

Methylglyoxal entsteht verhältnismäßig langsam und erreicht nach 240 min eine Konzentration von 1,64 mol%

Auch *Glyoxal* ist nur in einer geringen Konzentration im Reaktionsgemisch nachweisbar. Am Ende der Reaktionszeit liegen 1,05 mol% des C2-Fragmentes vor.

In wässriger Lösung reagiert ein relativ großer Teil des Amadoriproduktes zu 1- und 3-Desoxyhexosulose. Damit zeigt sich, dass ein neutraler pH-Wert die 2,3-Enolisierung etwas bevorzugt. Weitere Reaktionen die zur 1,4-Di-desoxyhexosulose führen würden, laufen entweder sehr langsam oder nur in geringem Umfang ab. Auch Fragmentierungsreaktionen, die zur Bildung von Methylglyoxal oder Glyoxal führen, spielen bei der Reaktion von Fructosglycin im Wässrigen eine untergeordnete Rolle.

Die vorliegenden Ergebnisse stimmen im Bezug auf die Bildung von α -Dicarbylen aus Fructosglycin sehr gut mit den Arbeiten von Feather et al. (1996) überein.

5.7.2 Abbau des Amadoriproduktes

Der Abbau des Amadoriproduktes verläuft langsam. Nach 60 min Reaktionszeit liegt der übergroße Anteil des Ausgangsstoffes (97,8 mol%) noch in der Lösung

vor. Im weiteren Verlauf sinkt die Konzentration stärker. Nach 120 min sind noch 84,7 mol% vorhanden und nach 180 min liegen noch 72,6 mol% vor. Erst im letzten Intervall der Reaktionszeit nimmt die Menge an Fructosglycin schneller ab, so dass nach 240 min nur noch 41 mol% im Reaktionsgemisch enthalten sind.

Im Vergleich zum korrespondierenden Versuch unter quasi wasserfreien Bedingungen verläuft der Abbau in wässriger Lösung sehr langsam. Allerdings wird in wässriger Lösung wesentlich mehr Amadoriprodukt in die untersuchten α -Dicarbonylen umgewandelt. Unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen hingegen wird das Amadoriprodukt schnell abgebaut, reagiert aber nur in geringem Umfang zu α -Dicarbonylen weiter.

Die hohe Verdünnung des Fructosglycins und die Anwesenheit von Wasser haben offensichtlich einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und auf das Produktspektrum.

Erstaunlich ist auch die Tatsache, dass geringe Mengen an D-Glucose im Reaktionsgemisch feststellbar sind (1,5 mol% nach 240 min). Heyns et al. (1957) geben in ihren Arbeiten über die Reaktion des Amadoriproduktes an, dass die Amadori-Umlagerung weitgehend irreversibel ist, jedoch in der sauren Hydrolyse von Amadoriprodukten Spuren von D-Glucose nachgewiesen werden konnten.

5.7.3 Vergleich der Amadoriprodukt- und α -Dicarbonylbildung im wässrigen Reaktionsgemisch D-Glucose/Glycin/OPD mit der α -Dicarbonylbildung aus Fructosglycin/OPD

Im wässrigen Maillard-Reaktionsgemisch wird nur eine geringe Menge des Amadoriproduktes von D-Glucose gebildet. Auch nach 240 min Reaktionszeit sind nur 3 mol% des Fructosglycins nachweisbar. Da in den Umsetzungen mit Fructosglycin der Abbau des Ausgangsstoffes relativ langsam verlief, ist die geringe Konzentration des Amadoriproduktes im Maillard-Reaktionsgemisch nicht auf eine schnelle Abreaktion des Intermediates zurückführbar.

Auf der anderen Seite zeigt der Versuch mit Fructosglycin und OPD auch, dass das Amadoriprodukt ein potenter Precursor für 1-Desoxyhexosulose und 3-Desoxyhexosulose ist.

Es ist also wahrscheinlich, dass die nachgewiesenen sehr geringen Mengen dieser Hexosulosen im wässrigen Maillard-Reaktionsgemisch zu einem größeren Teil

über das Amadoriprodukt gebildet werden als unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen. Wie auch in den Versuchen mit dem Amadoriprodukt überwiegt im Maillard-Reaktionsmodell die 1-Desoxyhexosulose leicht gegenüber der 3-Desoxyhexosulose, während 1,4-Didesoxyhexosulose keine Rolle spielt. Auch das Produktspektrum deutet auf die wichtige Rolle des Amadoriproduktes innerhalb der Maillard-Reaktion in wässriger Lösung hin.

Anders verhält es sich bei der Bildung von Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur. Selbst wenn eine 0,25 M Lösung des Fructosglycins eingesetzt wird, werden nicht dieselben Konzentrationen an Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur wie im entsprechenden Maillard-Reaktionsgemisch erreicht.

Wahrscheinlich läuft die Bildung dieser Zuckerfragmente, wie schon durch Hayashi et al. (1985, 1986a) und Weenen (1998) beschrieben, verstärkt über die Schiff'sche Base und das 1,2-Enaminol ab. Das Amadoriprodukt ist eindeutig nicht der zentrale Precursor für diese Reaktion. Außerdem könnte die Anwesenheit von freier Aminosäure entscheidend für die Basenkatalyse der Retro-Aldolreaktion sein.

6 Caramelisierung und Maillard-Reaktion von Dextrin 10 im wässrigen Reaktionsmilieu

Nachdem einzelne, kleinere Oligosaccharide innerhalb der Caramelisierung und Maillard-Reaktion untersucht worden sind, soll eine Umsetzung von Dextrin 10 die postulierten Reaktionsmechanismen für den Abbau von Oligosacchariden absichern.

Dextrin 10 ist ein Oligosaccharidmodell, das sich hauptsächlich aus kurzkettigen α -1 \rightarrow 4-verknüpften Glucanen zusammensetzt. Es enthält 10 % reduzierende Substanzen, geringe Mengen an D-Glucose aber auch Oligomere bis zu einem Polymerisierungsgrad von 30.

Die geringe Menge an reaktiven, reduzierenden OH-Gruppen im Dextringemisch muss durch eine höhere Einwaage ausgeglichen werden. Da sich für Dextrin 10 keine Molmasse festlegen lässt, wurde die Konzentration der Ausgangsstoffe so gewählt, dass die Konzentrationen von OPD, und im Fall der Maillard-Reaktion auch von Glycin, 0,25 M sind. Die Konzentration des Dextrin 10 wurde auf die 10-fache Masse von Glycin festgesetzt.

6.1 α -Dicarbonylbildung während der Caramelisierung

Die Menge der entstandenen α -Dicarbonyle wird in Masse% angegeben, da die molare Masse an eingesetztem Dextrin 10 unbekannt ist. Allerdings ergibt sich dadurch bei gleicher Konzentration für die Zuckerfragmente mit α -Dicarbonylstruktur ein kleinerer Wert als für die untersuchten Hexosulosen oder Pentosulosen.

Im Reaktionsgemisch Dextrin 10/OPD finden sich im HPLC-Chromatogramm einige Peaks, die das typische UV-Spektrum für Chinoxaline aufweisen. Die Chinoxaline von 3-Desoxypentosulose und Glyoxal lassen sich zu zwei Peaks zuordnen.

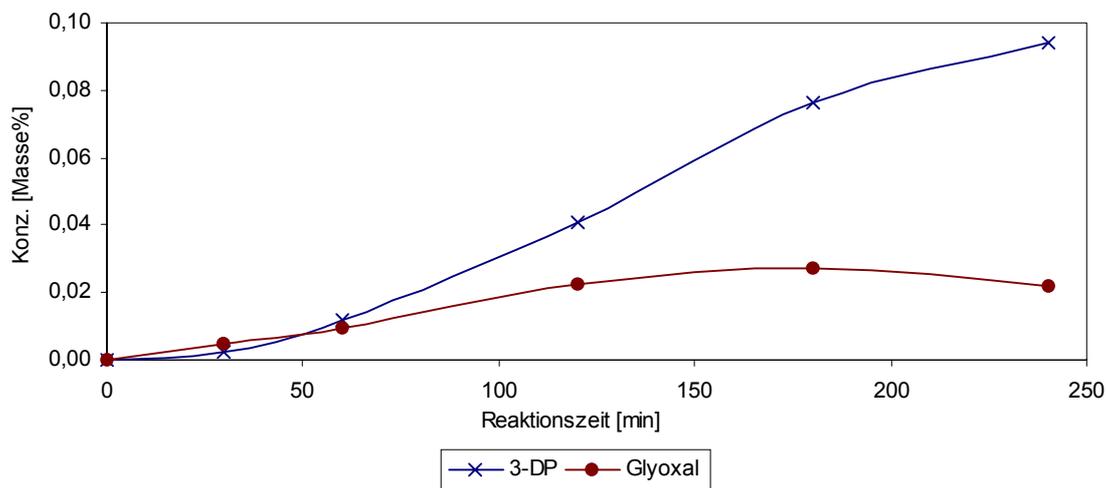


Abb. 58 Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,270 g in 10 ml)

Die Ausbeuten an beiden α -Dicarbonylen sind sehr gering.

Während *Glyoxal* mit maximal 0,03 Masse% nach 180 min (Abb. 58) auf einem sehr niedrigen Niveau bleibt, steigt die Konzentration von

3-Desoxypentosulose bis zum Ende der Reaktionszeit auf immerhin 0,09 Masse% an (Abb. 58). Nach einer kurzen Induktionsphase nimmt die Konzentration von 3-Desoxypentosulose zwischen 60 min und 180 min kontinuierlich zu. Danach flacht die Konzentrations-Zeit-Kurve wieder etwas ab.

6.2 α -Dicarbonylbildung während der Maillard-Reaktion

Durch den Zusatz von 10 Masse% Glycin (bezogen auf Dextrin 10) ist im Maillard-Reaktionsgemisch interessanterweise lediglich eine signifikante Steigerung der Bildung von 3-Desoxypentosulose zu beobachten.

Die Menge an gebildetem *Glyoxal* wird durch den Zusatz von Glycin kaum beeinflusst und übersteigt auch in Anwesenheit der Aminosäure nicht die Konzentration von 0,03 Masse%, die auch unter Caramelisierungsbedingung nach 180 min Reaktionszeit erreicht wird (Abb. 59).

Die Bildung von *3-Desoxypentosulose* nimmt dagegen unter dem Einfluss der Aminosäure stark zu. Nach einer Induktionsphase von ca. 30 min steigt die Konzentration dieses α -Dicarbonyls kontinuierlich an und erreicht nach 240 min Reaktionszeit einen Wert von 0,28 Masse%. Da die Bildungsgeschwindigkeit (Anstieg der Konzentrations-Zeit-Kurve) fast über den gesamten Reaktionszeitraum hinweg konstant bleibt, kann darauf geschlossen werden, dass die Reaktion am Ende des beobachteten Reaktionszeitraumes nicht beendet ist, sondern dass die Bildung von 3-Desoxypentosulose auch nach den 240 min weiter andauert.

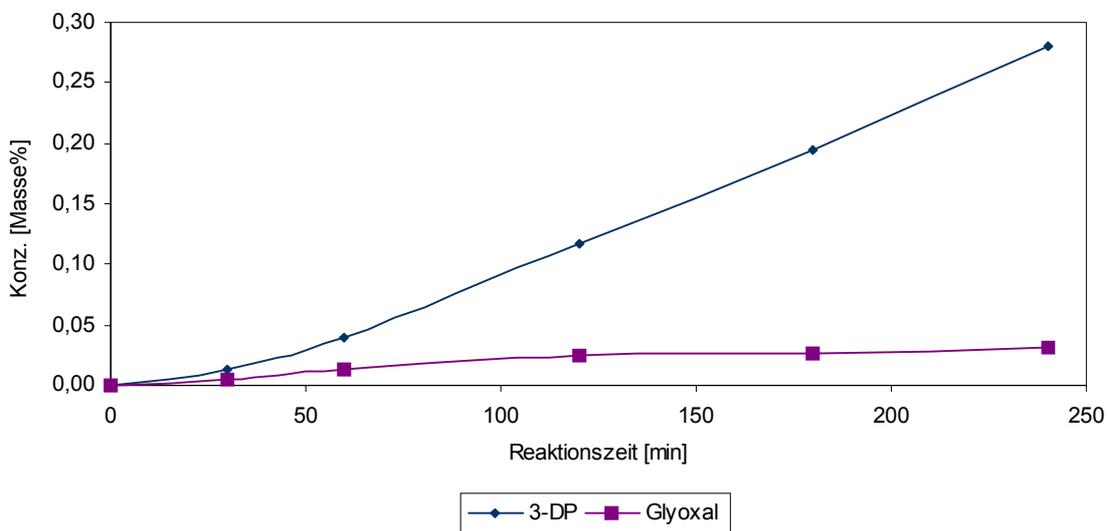


Abb. 59 Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /Gly/OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,1875 g/0,270 g in 10 ml)

Offensichtlich setzt sich bei Dextrin 10 der Trend fort, der für Maltose und Maltotriose beobachtet wurde. In wässriger Lösung wird durch den Zusatz von

Glycin die Bildung von 3-Desoxypentosulose stark erhöht. Andere α -Dicarbonyle sind im Reaktionsgemisch entweder nicht sicher nachweisbar oder ihre Konzentration wird nicht entscheidend durch den Zusatz der Aminosäure beeinflusst.

Dieses Ergebnis bestätigt die Relevanz des vorgeschlagenen Reaktionsweges über die Retro-Claisen Esterkondensation für die Bildung von α -Dicarbonylen aus Oligosacchariden.

Obwohl die Ausbeute, bezogen auf die Menge des Ausgangsstoffes Dextrin 10, eher gering ist, scheint doch die Retro-Claisen Esterkondensation innerhalb der Maillard-Reaktion eine bedeutende Rolle zu spielen. Andere Abbauege für das Dextrin 10, z. B. durch Hydrolyse, führen sicherlich auch zu einer Aktivierung der Saccharidkomponente. Allerdings lässt das Fehlen von 1- und 3-Desoxyhexosulose darauf schließen, dass zumindest im beobachteten Zeitraum nicht genug D-Glucose entstanden ist, um das Produktspektrum an α -Dicarbonylen zu beeinflussen.

Die verstärkte Bildung von 3-Desoxypentosulose in Maillard-Reaktionsgemischen mit Oligosacchariden sollte sich auch in der Aroma- und Farbstoffbildung im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion manifestieren.

7 Schlussfolgerungen und Diskussion der Relevanz der Ergebnisse für das Verständnis der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden

Grundlegende Untersuchungen zeigen, dass OPD für die Bestimmung der Bildung der α -Dicarbonyle in Caramelisierungs- und Maillard-Reaktionsgemischen mit gewissen Einschränkungen gut geeignet ist. In der Mehrzahl der Untersuchungen wird das Analyseergebnis nicht sehr stark durch die Anwesenheit von OPD beeinflusst. Trotzdem muss den untersuchten Reaktionsgemischen ein Modellcharakter beigemessen werden. Zur Verringerung des Einflusses des 'Abfangreagenz' auf die Untersuchungsergebnisse werden deshalb die vorliegenden Resultate immer im Zusammenhang gesehen. Ausschließlich die Veränderungen bezüglich eines Analyten bei der Variation eines Reaktionsparameters werden diskutiert.

Bei der Umsetzung von D-Glucose unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen wird deutlich, dass während der Caramelisierung nur wenig

Fragmente mit α -Dicarbonylstruktur entstehen, während die Bildung von *Methylglyoxal* und *Diacetyl* im Maillard-Reaktionsgemisch durch die Anwesenheit von Glycin stark erhöht ist.

Glyoxal hingegen wird aus D-Glucose unter Maillard-Reaktionsbedingungen in ähnlichem Umfang gebildet wie bei der doppelten Konzentration von OPD. Wahrscheinlich wird *Glyoxal* hauptsächlich über eine basenkatalysierte Retro-Aldolreaktion der D-Glucose gebildet. Im Gegensatz zu *Methylglyoxal* und *Diacetyl* entsteht weniger *Glyoxal* aus D-Glucose-Glycin-spezifischen Reaktionen. Bei der Thermolyse von D-Fructose unter quasi wasserfreien Bedingungen sind die Ausbeuten an α -Dicarbonylen geringer als bei D-Glucose. Unter Caramelisierungsbedingungen wird während der beobachteten Reaktionszeit kein *Diacetyl* gebildet, und die Konzentrationen von *Glyoxal* und *Methylglyoxal* bleiben gering. Erst der Zusatz der Aminosäure bewirkt bei der Reaktion der Ketose eine verstärkte Bereitstellung von Precursoren für eine Retro-Aldolreaktion zu Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion. Zwar sind die Konzentrationen von *Glyoxal*, *Methylglyoxal* und *Diacetyl* bei der Reaktion von D-Fructose geringer als bei D-Glucose, die Steigerung der Ausbeuten an α -Dicarbonylen ist hier allerdings besonders deutlich.

Im Vergleich zu den Monosacchariden entstehen aus den Disacchariden Maltose und Maltulose die α -Dicarbonyle sowohl in der Caramelisierung als auch in der Maillard-Reaktion wesentlich langsamer. Die Reaktivität der Disaccharide ist in Bezug auf die Fragmentierung zu α -Dicarbonylen geringer als bei den Monosacchariden.

Außerdem ist in den Maillard-Reaktionsmodellen von Maltose und Maltulose ein Unterschied der gebildeten Produktspektren zu beobachten. Aus Maltose wird mehr *Methylglyoxal* gebildet, wohingegen aus Maltulose mehr *Glyoxal* und *Diacetyl* als aus Maltose entstehen.

Eine mögliche Erklärung könnte die unterschiedliche Position der Carbonylgruppe im Amadori- bzw. Heynsprodukt sein. Beim Umlagerungsprodukt der Maltose befindet sich die Carbonylgruppe an C2, was eine Retro-Aldolreaktion in zwei C3-Fragmente unterstützt. Beim Heynsprodukt könnte durch die an C1 befindliche Carbonylgruppe eine ähnliche Retro-Aldolreaktion verstärkt werden, die zur Bildung von C2- und C4-Fragmenten am reduzierenden Ende führt. Diese Überlegungen müssten auch für die Umlagerungsprodukte von D-Glucose und

D-Fructose gelten, jedoch müssen hier auch Faktoren wie die furanoide Konformation der D-Fructose und die unterschiedliche Stabilität von Umlagerungsprodukten der Mono- und Disaccharide sowie die Möglichkeit der Weiterreaktion ihrer Enolisierungsprodukte beachtet werden.

Werden statt Monosacchariden Di- und Oligosaccharide in den Modellmischungen eingesetzt, zeigt sich, dass sich das Spektrum der gebildeten α -Dicarbonyle, besonders der Desoxyhexosulosen, verändert.

Mit steigendem Polymerisierungsgrad nimmt die Bedeutung der *1,4-Didesoxyhexosulose* zu, und diese Desoxyhexosulose dominiert das Spektrum der untersuchten α -Dicarbonyle, obwohl die Reaktivität der Saccharide insgesamt abnimmt. Andere α -Dicarbonyle entstehen in geringeren Konzentrationen. Unter Maillard-Reaktionsbedingungen wird wesentlich mehr 1,4-Didesoxyhexosulose gebildet als in Abwesenheit von Glycin, sie ist vorwiegend ein Produkt der Maillard-Reaktion.

Der Abbau des Ausgangsstoffes verläuft bei Caramelisierung und Maillard-Reaktion sowohl für Maltose als auch für Maltotriose langsamer als für D-Glucose. Auch die Isomerisierung zur Ketose verläuft in quasi wasserfreier Caramelisierung mit zunehmendem Polymerisierungsgrad langsamer.

Dasselbe gilt auch für die Bildung von Amadoriprodukten während der Maillard-Reaktion.

Aus dem Amadoriprodukt entstehen unter quasi wasserfreien Reaktionsbedingungen verhältnismäßig geringe Konzentrationen an α -Dicarbonylen. Deshalb kann es im Maillard-Reaktionsgemisch nicht der dominierende Precursor für diese Substanzen sein. Vielmehr stellen das 1,2-Enaminol bzw. die Schiff'sche Base weitere wichtige Intermediate bei der Bildung von Desoxyhexosulosen und Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylfunktion dar.

Außerdem wurde für die Maillard-Reaktion von Oligosacchariden festgestellt, dass sich im Vergleich zur Caramelisierung verstärkt Saccharide mit geringerem Polymerisierungsgrad als der Ausgangsstoff bilden.

Dieses Ergebnis und die hohe Konzentration von *1,4-Didesoxyhexosulose* führen zu der Annahme, dass der Abbau des Saccharids die Bildung dieser

Desoxyhexosulose bei Oligosacchariden über einen „Peeling Off“-Mechanismus am reduzierenden Ende abläuft.

Es wird angenommen, dass sich dabei am reduzierenden Ende des Moleküls das Amadoriprodukt bildet, welches nach Enolisierung zum 2,3-Endiol in der Lage ist, den glycosidischen Rest am C4 zu eliminieren. Eine nachfolgende Reduktion und vinyloge β -Eliminierung führen dann zur *1,4-Didesoxyhexosulose*, die bis zu 18 mol% in quasi wasserfreien Maillard-Reaktionsgemischen von Maltose gefunden wird.

Die Verschiebungen im Spektrum der α -Dicarbonyle bei der nichtenzymatischen Bräunung unter quasi wasserfreien Bedingungen wirken sich, wie in 1.1.5. beschrieben, wahrscheinlich auch verändernd auf das Produktspektrum der niedermolekularen, flüchtigen Verbindungen aus. In letzter Konsequenz sollte sich in Abhängigkeit von den Ausgangsstoffen und den unterschiedlichen Abbaumechanismen auch die Zusammensetzung des hochmolekularen Melanoidins verändern.

Mit zunehmendem Wassergehalt macht die hydrolytische Spaltung der Kohlenhydratkette einen wichtigen Teil der Abbaureaktionen aus. Zusätzlich wird auf Grund der Produkthemmung der Saccharideabbau durch Dehydratisierungsreaktionen zurückgedrängt. So läuft in wässriger Lösung die Bildung von Desoxyhexosulosen und Zuckerfragmenten mit α -Dicarbonylstruktur in Caramelisierung und Maillard-Reaktion langsamer ab als im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu.

Bei Umsetzungen von Maltose und Maltotriose, besonders unter Maillard-Reaktionsbedingungen, wird zum ersten Mal *3-Desoxypentosulose* gefunden. Da unter Maillard-Reaktionsbedingungen ebenfalls verstärkt D-Glucose und Maltose aus den genannten Oligosacchariden entstehen, liegt es nahe, dass die *3-Desoxypentosulose* ähnlich wie *1,4-Didesoxyhexosulose* am reduzierenden Ende gebildet wird.

Der Abbau der eingesetzten Kohlenhydrate verläuft in wässriger Lösung langsamer als unter quasi wasserfreien Bedingungen. Der Zusatz von Glycin beschleunigt den Abbau von D-Glucose und Maltotriose gleichermaßen. Offensichtlich kommt der hydrolytischen Spaltung der glycosidischen Bindung

neben der Reaktion der glycosidischen OH-Gruppe, besonders für Saccharide mit höherem Polymerisierungsgrad, eine wachsende Bedeutung zu.

Besonders bei der Caramelisierung ist die Isomerisierung zur jeweiligen Ketose für die Umsetzung von Bedeutung. Die Bildung von Ketosen mit einer erhöhten Konzentration an furanoidem Isomer und, im Fall der D-Fructose offenkettiger Form, kann eine Aktivierung des Saccharides bedeuten (s. 1.1.1.). In Maillard-Reaktionsgemischen wird die Isomerisierung wahrscheinlich durch Reaktionen der Aminosäure mit der glycosidischen OH-Gruppe zurückgedrängt. Es ist aber auch möglich, dass die Ketosen schnell mit Glycin reagieren und dadurch nur in geringen Mengen nachweisbar sind.

Da aus reinem Fructosglycin in wässriger Lösung verhältnismäßig viel Desoxyhexosulosen entstehen, scheint das Amadoriprodukt trotz geringer Konzentration zumindest für die Maillard-Reaktion von Monosacchariden in wässriger Lösung ein wichtiger Precursor für die Bildung von Desoxyhexosulosen zu sein.

Für den Bildungsmechanismus von *3-Desoxypentosulose* wird erneut davon ausgegangen, dass die Spaltung der glycosidischen Bindung durch vinyloge β -Eliminierung des 2,3-Endiols des Amadoriproduktes ausgelöst wird. Durch das vorliegende Wasser und den neutralen pH-Wert könnte mittels Retro-Claisen Esterkondensation der C1-Körper als Ameisensäure abgespalten werden, so dass aus dem verbleibenden Pentosederivat entweder *3-Desoxypentosulose* oder auch andere bereits von anderen Autoren beschriebene Maillard-Reaktionsprodukte entstehen können, die auf dieses Intermediat zurückzuführen sind (s. 5.4.).

Dieser Abbauweg ist auch für höhere Oligosaccharide relevant. Das zeigen die Experimente mit Dextrin 10, in denen ebenfalls die *3-Desoxypentosulose* das Spektrum der α -Dicarbonyle beherrscht.

Da die untersuchten α -Dicarbonyle eine Schlüsselstellung innerhalb der nichtenzymatischen Bräunung einnehmen, werden sich die Veränderungen des Spektrums an α -Dicarbonylen in der veränderten Bildung von flüchtigen, z.T. aromaaktiven Verbindungen fortsetzen. Zwar sind nur wenige der flüchtigen Maillard-Reaktionsprodukte eindeutig dem einen oder anderen α -Dicarbonyl zuzuordnen, trotzdem wird vermutet, dass der Polymerisierungsgrad einen ähnlich starken Einfluß auf das Spektrum der Maillard-Reaktionsprodukte hat wie

die Veränderung des pH-Wertes vom sauren ins neutrale/schwach alkalische Milieu.

Niedrig- und hochmolekulare Endprodukte der Maillard-Reaktion sollten in Abhängigkeit von der Verteilung der α -Dicarbonyle variieren. Speziell Antioxidantien, wie Aminoreduktone, könnten bei der Maillard-Reaktion von Oligosacchariden besonders stark gebildet werden, da die vinyloge β -Eliminierung *1-Amino-1,4-Dideoxyhexosulose* freisetzt. Diese Verbindung wandelt sich leicht in Aminoreduktone umwandelt (Estendorfer et al., 1990 und Pischetsrieder et al., 1998a,b).

Die genaue Kenntnis der Bildungsmechanismen der einzelnen α -Dicarbonyle und ihre Verteilung unter den verschiedenen Reaktionsbedingungen mit den verschiedenen Ausgangsstoffen kann dazu beitragen, dass der Verlauf der Maillard-Reaktion durch die Wahl der Reaktionsparameter leichter und spezifischer beeinflussbar wird.

Aufbauend auf den hier gewonnenen Erkenntnissen, könnte man in Zukunft die Bildung von α -Dicarbonylen auch in Lebensmittelmodellen untersuchen. Der Nachweis bestimmter α -Dicarbonyle könnte dann ein Indikator für die Bildung von spezifischen Produkten sein, die im weiteren Ablauf der Maillard-Reaktion gebildet werden. Eventuell könnte dann schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt der nichtenzymatischen Bräunung vorhergesagt werden, welche flüchtigen und nichtflüchtigen Endprodukte sich im weiteren Verlauf der Reaktion bilden werden.

Durch die genauen Kenntnisse der jeweils ablaufenden Reaktionen bei jedem Verarbeitungsschritt und durch das Wissen um die Abhängigkeit des Spektrums an α -Dicarbonylen von den Reaktionsbedingungen könnte es möglich sein die nichtenzymatische Bräunung besser zu steuern.

Die Optimierung von thermischen Prozessen während der Lebensmittelverarbeitung bietet z.B. die Möglichkeit Nahrungsmittel mit angenehmen sensorischen Eigenschaften, hoher Aminosäureverfügbarkeit oder geringen Mengen an heterocyclischen Aminen zu erzeugen.

8 Experimenteller Teil

8.1 Chromatographische und spektroskopische Methoden einschließlich Derivatisierungstechniken

8.1.1 Qualitative Dünnschichtchromatographie

Merck, DC-Alufolien, beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (DC₁) oder Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator (DC₂), Schichtdicke 0,2 mm

8.1.2 Säulenchromatographie

Merck Kieselgel (KG 60, 0,063 – 0,200 mm)

Säulendurchmesser/-länge [cm]: 2/ 40

Kieselgel wird in der jeweiligen mobilen Phase aufgeschlämmt und in die Säule eingefüllt. Fraktionen werden in 20 ml Reagenzgläsern mittels eines Pharmacia LKB RediFrac gesammelt und mit DC₁ unter Verwendung der mobilen Phase als Laufmittel überprüft.

8.1.3 HPTLC

Merck, HPTLC-Platten Kieselgel 60, 20 *10 cm

Monosaccharide:

Laufmittel: Chloroform (Merck, HPLC grade), Essigsäure (Merck, 96%), Methanol (Merck suprasolv) und Wasser (60/ 18/ 12,5/ 5; v/v/v/v);

Die Platten wurden zweimal in einer klassischen DC-Kammer entwickelt.

Di- und Trisaccharide:

Laufmittel: Chloroform, Methanol und Wasser (50/40/8; v/v/v); in dieser Mischung wurden 2,5-2,8 mg Borsäure gelöst.

Die HPTLC-Platten wurden doppelt in einer AMD-Kammer (CAMAG) entwickelt.

Detektion:

Die entwickelte HPTLC-Platte wird in eine Mischung aus Diphenylamin/ Anilin/ Methanol/ 85 %ige Phosphorsäure (1 g/1 ml/100 ml/10 ml) getaucht, getrocknet und anschließend einige Minuten auf eine Temperatur von 120 °C erwärmt

8.1.4 Gaschromatographie (GC/FID)

Shimadzu GC14A, Flammenionisationsdetektor

Trennsäule: Kapillarsäule DB 1701 (Macherey & Nagel, 30 m, ID 0,32 mm, Fth 0.25 µm)

Trägergas: Stickstoff

Splitverhältnis: 1:20

Injektionsvolumen: 2 µl

Injektor-/Detektortemperatur: 280 °C

Temperaturprogramm: 120 °C isotherm 5 min, 120 °C→200 °C (10 °C/ min), 200 °C isotherm 5 min, 200 °C→280 °C, (10 °C/ min), 280 °C isotherm 9 min.

8.1.5 Gaschromatographie (GC/MS)

Hewlett-Packard 5890 Series II Gaschromatograph gekoppelt mit Hewlett-Packard 5989B mass spectrometer

Trennsäule: Kapillarsäule DB-5HT (J&W; 30 m, ID 0,32 mm, Fth 0.1 µm)

Trägergas: Helium

Splitverhältnis: 1:20

Injektionsvolumen: 2 µl

Injektor-/Detektortemperatur: 280 °C

Temperaturprogramm: 120 °C isotherm 5 min, 120 °C→200 °C (10 °C/ min), 200 °C isotherm 5 min, 200 °C→280 °C (10 °C/ min), 280 °C isotherm 9 min.

Es wurde im Bereich m/z 40-800 amu gescannt.

8.1.6 Extraktion der Chinoxaline und Acetylierung

Nach der Thermolyse werden die Proben in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. 1 ml Lösung wird dreimal mit 5 ml Dichlormethan mittels eines Mixxors[®] extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

Acetylierung: Der Rückstand wird in 400 µl Pyridin und 400 µl Acetanhydrid gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht aufbewahrt (Nedvidek, 1992).

8.1.7 HPLC/DAD

Shimadzu LC 10 AT mit DAD Kontron 440

Degasser: Degasys DG-13000, Knauer

Thermostat: Haake F3, Fisons

Vorsäule: Nucleosil 120-5 C₁₈ Macherey-Nagel

Trennsäule: Nucleosil 5 C₁₈; 250*4.6, 5 µm

Flussrate: 1.0 ml/ min

Temperatur: 30 °C

Injektionsvolumen: 20 µl

mobile Phase: Eluent A: Methanol, Eluent B: Wasser (beides HPLC grade);

Gradient: 0-5 min 5 % A; 5-25 min 5→ 50 % A, 25-30 min 50→ 100 % A, 30- 40 min 100 % A

Wellenlänge: full scan 190 nm - 440 nm für Identifizierung, 320 nm für Quantifizierung

Verdünnungen: v₀⁰ (20 mg/100 ml), v₀¹ (18 mg/100ml), v₀² (14 mg/100 ml), v₀³ (10 mg/100 ml), v₀⁴ (4 mg/100 ml), v₀⁵ (2 mg/100 ml), v₀⁶ (1 mg/100 ml)

8.1.8 HPAEC/PAD

Dionex GP 40 mit PAD, Dionex

Säulenofen: HPLC column oven 2155, Pharmacia

Temperatur: 25 °C

Trennsäulen: 2 x PA-100, 250 x 4 mm, Dionex

Injektionsvolumen: 20 µl

Flussrate: 0.5 ml/ min

mobile Phase: Eluent A: 0.15 N NaOH, Eluent B: 1 N NaAc in 0.15 N NaOH;

Gradient: 0-10 min 100 % A, 10-60 min 0→60 % B

Quantifizierung: extern, Ein-Punkt-Kalibration

8.1.9 HPLC/Fluoreszenzdetektor (Furosinanalytik)

Spectraphysics P2000 Binary Gradient mit Spectraphysics UV2000 Dual UV/Vis);

Trennsäule: furosin-spezifisch, 250*4.6, 5 µm, Alltech

Flussrate: 1.2 ml/ min

Säulentemperatur: Raumtemperatur

Injektionsvolumen: 20 µl

mobile Phase: Eluent: A: 0.4 % Essigsäure (v/v), Eluent B: 0.3 % KCl in A (w/v),

Wellenlänge: 280 nm

Gradient: 0-11.5 min 100 % A; 11.5-18 min 100→ 50 % A, 18.5-21 min 50 % A, 21-23 min 50→ 100 % A, 23- 32 min 100 % A. Quantifizierung mittels externer

Kalibration: extern; Konzentration der Standards: 8-16-24-32 µM Furosin

Retentionszeit Furosin: 22-23 min,

Gesamtlaufzeit: 32 min

8.1.10 $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Bruker NMR Spektrometer, DPX 300, AM 300

8.2 Synthesen

8.2.1 Chemikalien:

D-Glucose (Merck), Maltose (Merck), Maltotriose (Fluka), Dextrin 10 (Merck), D-Fructose (Fluka) Maltulose (Aldrich), Glycin (Serva), o-Phenylendiamin (OPD) (Aldrich), Dichlormethan (Riedel-de-Häen), Methanol (Merck, suprasolv), Natriumsulfat wasserfrei (Merck), Pyridin (Merck), Acetanhydrid (Merck), Diphenylchinoxalin (Aldrich), Chinoxalin (Merck), Tetrahydrochinoxalin , Methyl chinoxalin, 2,3-Di-methylchinoxalin (alle Lancaster Synthesis)

8.2.2 Darstellung von 2-Methyl-3-(1,2,3-trihydroxypropyl)- chinoxalin

2-Methyl-3-(1,2,3-trihydroxypropyl)-chinoxalin wird aus dem Amadoriprodukt 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose durch Umsetzung mit OPD gewonnen (Hodge und Fisher, 1963; Beck und Ledl, 1988).

Darstellung von 1-Desoxy-1-piperidino-D-fructose

In einem Dreihalskolben mit Thermometer, Rückflusskühler und Rührvorrichtung, werden 1 mol D-Glucose (wasserfrei, 180 g) in 150 ml (1,13 mol) Triethanolamin gelöst. Unter starkem Rühren werden Piperidin (85 g, 1 mol) und Eisessig (60 g, 1 mol) hinzugefügt. Die warme Mischung wird dann innerhalb von 20 min auf

70 °C erhitzt und die Temperatur wird für eine Stunde auf 70 °C gehalten. Der abgekühlte Reaktionsansatz beginnt zu kristallisieren und wird 2 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur vollständigen Kristallisation wird die Lösung bei 1 °C aufbewahrt, das Produkt wird auf einer Glasfritte abgesaugt und mit Ethanol/Aceton (1:1) bis zur Farblosigkeit gewaschen. Filtrat und Waschlösung ergeben nach Aufbewahren bei -17 °C noch eine weitere Fraktion Reaktionsprodukt. Die Kristalle werden im Exsikkator getrocknet; das Umkristallisieren erfolgt aus Methanol.

Darstellung von 2-Methyl-3-(1,2,3-trihydroxypropyl)-chinoxalin

Das Fructosylpiperidin (1.24 g, 5 mmol) wird mit der doppelten Menge OPD (1.1 g, 10 mmol) in Phosphatpuffer (pH 7, 10 ml) gelöst, am Rückfluss 10 h gekocht und dann konzentriert. Das Konzentrat wird in Methanol gelöst, filtriert und wieder konzentriert. Der erhaltene feine Niederschlag ist in der Wärme löslich und langsames Abkühlen der Lösung resultiert in guter Kristallisation. Wiederholtes Umkristallisieren aus Aceton ergibt ein gelblich weißes Kristallisat.

¹H-NMR (300 MHz) in CD₃OD (Aldrich) δ: 2.85 (s, 3H), 3.85 (dd, 1H), 3.93 (dd, 1H), 5.95 (d, 1H), 7.74 (m, 2H), 7.96 (m, 1H), 8.07 (m, 1H);

Massenspektrum der acetylierten Verbindung m/z: 360 (0.2 %, M⁺), 301 (4), 300 (4), 241 (18), 199 (51), 198 (12), 216 (45), 174 (100), 157 (5), 143 (23), 107 (22), 103 (9), 43 (96).

8.2.3 Darstellung von 2-(2,3,4-Trihydroxybutyl)-chinoxalin

Durch Umhydrazonisierung von 3-Desoxyhexosulosebisbenzoylhydrazon erhält man freie 3-Desoxyhexosulose (Madson und Feather, 1981)., die direkt mit OPD umgesetzt wird

Darstellung von 3-Desoxyhexosulose-bisbenzoylhydrazon

20 g D-Glucose (0,11 mol) und 11 g p-Toluidin (0,10 mol) werden in 95 %igem Ethanol (450 ml) mit 22 ml Essigsäure 30 min am Rückfluss gekocht. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches gibt man Benzoylhydrazin (33 g, 0,24 mol) hinzu und kocht für weitere 7 h am Rückfluss. Danach läßt man auf Raumtemperatur abkühlen, wobei das Bishydrazon von 3-Desoxyhexosulose auskristallisiert. Die Kristallisation wird bei 4 °C vervollständigt und man saugt nach 12 h das Produkt ab. Das Kristallisat wird gewaschen (3* 100 ml Methanol, 3* 100 ml Diethylether, 3* 100 ml Methanol) und getrocknet. Höhere Reinheit wird durch Umkristallisieren aus Ethanol erreicht.

Darstellung von 3-Desoxyhexosulose

10 g (0,025 mol) 3-Desoxyhexosulose-bisbenzoylhydrazon werden in einem Gemisch aus Ethanol (300 ml), Wasser (500 ml) und Essigsäure (3,1 ml) suspendiert und man gibt 16 ml (0,16 mol) frisch destillierten Benzaldehyd hinzu. Die Suspension wird am Rückfluss gekocht bis eine Kristallisation des Benzaldehydbenzoylhydrazons zu beobachten ist, man setzt die Reaktion noch 1,5 h fort. Der überschüssige Benzaldehyd wird azeotrop überdestilliert, indem man 500 ml Wasser zum Reaktionsgemisch gibt und am Rotationsverdampfer bis zur beginnenden Kristallisation einengt. Nach vollständiger Kristallisation des Benzoylbishydrazons saugt man das Reaktionsgemisch ab. Dem Filtrat wird Anionenaustauscher (IRA-93, OH⁻) zur Neutralisation zugesetzt. Nach erneuter Filtration und gründlichem Waschen des Austauscherharzes mit Wasser wird das Filtrat zum Sirup eingengt und mit Aktivkohle (Norit) entfärbt. Es wird ein leicht gelblicher Sirup von 3-Desoxyhexosulose gewonnen.

Darstellung von 2-(2,3,4-Trihydroxybutyl)-chinoxalin

Zu der sirupösen 3-Desoxyhexosulose gibt man eine methanolische Lösung von OPD im Überschuss und lässt über Nacht bei Raumtemperatur unter Stickstoff rühren. Nach Abschluss der Reaktion engt man bis zur Trockne ein, nimmt den Rückstand in wenig Methanol auf und löst in der Wärme, langsames Abkühlen führt zur Kristallisation und weiteres Umkristallisieren aus Aceton liefert ein helles Kristallinat.

¹H-NMR (300 MHz) in CD₃OD δ 3.13 (dd, 1H), 3.42 (dd, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.66 (dd, 2H), 3.80 (dd, 1H), 7.77 (m, 2H), 8.03 (m, 2H), 8.83 (M, 1H); Massenspektrum der acetylierten Verbindung m/z 360 (0.2 %, M⁺), 301 (7), 300 (9), 258 (12), 241 (14), 199 (33), 181 (24), 157 (34), 144 (100), 102 (11), 43 (89).

8.2.4 Darstellung von 2-(Arabino-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-chinoxalin

Das Chinoxalin von Glucoson wird aus der Umsetzung von D-Glucose und OPD in einem essigsäuren Methanol-Wassergemisch gewonnen (Morita et al., 1981).

36 g (0,2 mol) D-Glucose und 21,68 g (0,2 mol) OPD werden in einer Mischung aus Methanol, Essigsäure und Wasser (8:1:2, 200 ml) gelöst und unter Spülen mit Stickstoff 3 h auf 80 °C erhitzt. Nach Abkühlung und Vervollständigung der Kristallisation bei 4 °C wird abgesaugt, und man erhält einen weißlichen

Filtrerrückstand. Wiederholtes Umkristallisieren aus Ethanol führt zu einem gereinigten Reaktionsprodukt.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) in $\text{d}_6\text{-DMSO}$ (Aldrich) δ : 3.34 (s, 4H), 3.66 (dd, 1H), 4.65 (m, 1H), 5.14 (d, 1H), 5.59 (d, 1H), 7.80 (m, 2H), 8.05 (m, 2H), 9.08 (s, 1H);

Massenspektrum der acetylierten Verbindung m/z 418 (0.2 %, M^+), 359, (2), 358 (2), 299 (63), 257 (11), 215 (14), 213 (9), 202 (50), 196 (8), 160 (100), 143 (4), 129 (10), 115 (12) 102 (7), 43 (97).

8.2.5 Darstellung von 2-Methyl-3-(2,3-dihydroxypropyl)-chinoxalin

Auch das Chinoxalin der 1,4-Didesoxyhexosulose wird aus der Umsetzung von D-Glucose und OPD in einem essigsäuren Methanol-Wassergemisch gewonnen (Morita et al., 1981).

Das Filtrat aus der 2-(arabino-1,2,3,4-tetrahydroxybutyl)-chinoxalindarstellung wird eingeeengt und dreimal mit 200 ml Hexan zur Entfernung von restlichem OPD extrahiert (Morita et al. 1981).

Der Extraktionsrückstand wird nun mehrfach mit Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen werden eingeeengt, man nimmt den Rückstand in wenig Aceton auf und reinigt ihn mittels präparativer Säulenchromatographie (Säule 1, n-Hexan/ Diethylether/ Ethanol 2:2.1 v/v/v). Fraktionen, die 2-Methyl-3-(2,3-dihydroxypropyl)-chinoxalin enthalten, werden gesammelt und zur Trockne eingeeengt. Kristallisation aus Aceton ergibt ein weißes, kristallines Pulver.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz) in CD_3OD δ 2.77 (s, 3H), 3.17 (m, 2H), 3.65 (d, 2H), 4.30 (m, 1H), 7.70 (m, 2H), 7.94 (m, 2H);

Massenspektrum der acetylierten Verbindung m/z 302 (0.2 %, M^+), 243 (16), 242 (7), 183 (100), 171 (40), 143 (7), 158 (77), 117 (9), 102 (9).

8.2.6 Darstellung von 2-(2,3-Trihydroxypropyl)-chinoxalin

Parallel zur Darstellung des Chinoxalins von 3-Desoxyhexosulose wird die 3-Desoxy-pentosulose aus dem entsprechenden Bishydrazon durch Umhydrazonisieren gewonnen (Madson und Feather, 1981; Glomb, 1992).

Darstellung von 3-Desoxyhexosulose-bisbenzoylhydrazon

16,7 g (0,11 mol) Arabinose und 11 g (0,10 mol) p-Toluidin werden in einer Mischung aus 450 ml Ethanol und 22 ml Essigsäure gelöst und 30 min am Rückfluss gekocht. Nach kurzem Abkühlen fügt man 33 g (0,24 mol)

Benzoylhydrazin hinzu und kocht weitere 7 h am Rückfluss. Kühlt man das Reaktionsgemisch ab, beginnt das Bishydrazon auszukristallisieren. Zur vollständigen Kristallisation belässt man die Lösung über Nacht im Kühlschrank, saugt das Kristallinat auf der Nutsche ab und wäscht es mit Wasser, Methanol, Diethylether und wieder mit Methanol (jeweils 100 ml). Das Rohprodukt wird an der Luft getrocknet und zur Aufreinigung aus Ethanol umkristallisiert.

Darstellung der 3-Desoxypentosulose

Zur Umhydrazonisierung werden 7,5 g (0,02 mol) 3-Desoxypentosulosebisbenzoylhydrazon in einem Gemisch aus 300 ml Ethanol, 50 ml Wasser und 2,5 ml Essigsäure suspendiert und nach Zusatz von 12,8 ml (0,13 mol) Benzaldehyd, wird das Reaktionsgemisch 4,5 h am Rückfluss gekocht. Der Ethanol und überschüssiger Benzaldehyd werden nach Zugabe von 250 ml Wasser azeotrop überdestilliert. Nach vollständiger Kristallisation des Benzoylbishydrazons saugt man das Reaktionsgemisch ab. Dem Filtrat wird Anionenaustauscher (IRA-93, OH⁻) zur Neutralisation zugesetzt. Nach erneuter Filtration und gründlichem Waschen des Austauscherharzes mit Wasser wird das Filtrat zum Sirup eingeeengt und mit Aktivkohle (Norit) entfärbt.

Darstellung von 2-(2,3-trihydroxypropyl)-chinoxalin

Die Umsetzung mit OPD erfolgt parallel zu der Reaktion mit 3-Desoxyhexosulose. ¹H-N.m.r.(300 MHz) in CD₃OD δ 3.09 (dd, 1H), 3.24 (dd, 1H), 3.61 (dd, 2H), 4.15 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 8.02 (m, 2H), 8.83 (s, 1H); Massenspektrum der acetylierten Verbindung m/z: 288 (0.03 %, M⁺), 229 (5), 228 (4), 169 (42), 157 (24), 144 (37), 129 (3), 117 (4), 43 (100).

8.2.7 Darstellung von Fructosglycin

Die Synthese von Fructosglycin wurde entsprechend den Angaben von Kroh et al. (1992) durchgeführt.

5.25 g (0,07 mol) Glycin, 50.3 g (0.28 mol) D-Glucose und 6.6 g (0.04 mol) Natriumdisulfit werden 80 ml Methanol-Wasser (1:1) gemischt und 1,5 h am Rückfluss gekocht bis eine gelbliche Färbung auftritt. Die Lösung wird mit 250 ml eines Ethanol- Wassergemisches (1:1) aufgefüllt und langsam auf die Säule gegeben. Danach wäscht man den überschüssigen Zucker mit 750 ml desselben Ethanol- Wassergemisches von der Ionenaustauschersäule (Dowex 50 W*8,

3* 30) und wäscht nochmals mit 250 ml dest. Wasser. Anschließend wird das Produkt mit 0.1 M Ammoniaklösung (ca. 2 l) eluiert und in Fraktionen von ca. 50 ml gesammelt. Die Fraktionen werden mittels DC (auf DC₂ ; Laufmittel: Buthanol/ Eisessig/Wasser (12/3/5; v/v/v); Detektionsmittel: 1%ige ethanolische Ninhydrinlösung; bei 110 °C) überprüft und gegebenenfalls vereinigt. Das Amadoriprodukt wird ca. bei 1-1,3 l von der Säule gewaschen. Die Fraktionen, die reines Amadoriprodukt enthalten, werden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockne eingengt. Der verbleibende Sirup wird mit Methanol gewaschen und einige Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt bis sich ein weißer Niederschlag bildet, der mehrfach aus Methanol umkristallisiert wird.

Aktivierung der Dowex-Säule:

Waschen mit Ethanol, Wasser dann 1 h mit 1 M NaOH rühren und danach mit viel Wasser neutral waschen. Zur Beladung des Harzes wird 15 min mit 2 M HCl gerührt und wieder neutral gewaschen.

8.2.8 Darstellung von Maltulosglycin

Maltulosglycin wird nach einer ähnlichen Vorschrift wie Fructosglycin hergestellt, man geht von 5,25 g Glycin (0,07 mol) und 60 g Maltose (0,28 mol) aus.

8.3 Thermolyse

Die Thermolysen werden bei 100 °C in einem Thermoblock (Behrotherm) durchgeführt. Alle Experimente werden mindestens im Duplikat ausgeführt.

8.3.1 Caramelisierung im quasi wasserfreien Milieu (Saccharide/OPD; GC/FID)

1 mmol Saccharid wird mit 1 mmol bzw. 2 mmol o-Phenylendiamin (OPD; aus Wasser umkristallisiert) mittels eines Vortex innig vermischt, zuvor werden die Ausgangsstoffe einzeln fein gemörsert. Die Reaktionsgemische werden in Ampullen eingeschmolzen und für unterschiedliche Zeiten bei 100 ±1 °C thermolysiert. Nach dem Erhitzen löst man die Proben in 10 ml bidestilliertem Wasser und dotiert zu 1 ml der Lösung 100 µl internen Standard

(Diphenylchinoxalin 70 mg/ 10 ml Methanol). Nach Extraktion und Derivatisierung ist die Probe für Identifizierung und Quantifizierung der Chinoxaline mittels GC/MS bzw. GC/FID vorbereitet.

8.3.2 Maillard-Reaktion im quasi wasserfreien Milieu (Saccharide/Glycin/OPD; GC/FID)

1 mmol Saccharid wird mit 1 mmol Glycin und 1 mmol OPD mittels eines Vortex innig vermischt, zuvor werden die Ausgangsstoffe einzeln fein gemörsert. Die Reaktionsgemische werden in Ampullen eingeschmolzen und für unterschiedliche Zeiten bei 100 ± 1 °C thermolysiert. Weitere Behandlung der Probe s. Caramelisierung.

8.3.3 Caramelisierung im von Mono- und Oligosacchariden quasi wasserfreien Milieu (D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/OPD; HPLC/DAD)

1 mmol D-Glucose, Maltose Monohydrat oder Maltotriose und 1 mmol OPD werden innig gemischt und bis zu 480 min bei 100 ± 1 °C in verschlossenen Ampullen thermolysiert. Anschließend werden die Proben in Methanol oder einem Methanol-Wassergemisch gelöst und nach entsprechender Verdünnung mittels HPLC/DAD und HPTLC analysiert.

8.3.4 Maillard-Reaktion von Mono- und Oligosacchariden im quasi wasserfreien Milieu (D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/Glycin/OPD; HPLC/DAD)

1 mmol D-Glucose, Maltose Monohydrat oder Maltotriose, 1 mmol Glycin und 1 mmol o-Phenylendiamin werden innig gemischt und bis zu 480 min bei 100 ± 1 °C in verschlossenen Ampullen thermolysiert. Die weitere Behandlung der Proben wird, wie unter 9.3.3. beschrieben, durchgeführt.

8.3.5 Umsetzung von Fructosglycin im quasi wasserfreien Milieu (Fructosglycin/OPD; HPLC/DAD)

0,1 mmol Fructosglycin und 0,1 mmol o-Phenylendiamin werden innig gemischt und bis zu 240 min bei 100 ± 1 °C in verschlossenen Ampullen thermolysiert. Die weitere Behandlung der Proben wird, wie unter 9.3.3. beschrieben, durchgeführt.

8.3.6 Caramelisierung von Mono- und Oligosacchariden im wässrigen Milieu (0,25 M; D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/OPD; HPLC/DAD):

Dreimal 0.5 ml einer 0.25 M Lösung von D-Glucose, Maltose Monohydrat bzw. Maltotriose und OPD werden für unterschiedliche Zeiten (max. 240 min) bei 100 ± 1 °C in zugeschmolzenen Ampullen thermolysiert. Nach der Thermolyse werden die Proben vereinigt, gegebenenfalls mit Methanol verdünnt und mittels HPLC und HPTLC analysiert.

8.3.7 Maillard-Reaktion von Mono- und Oligosacchariden im wässrigen Milieu (0,25 M; D-Glucose, Maltose bzw. Maltotriose/Glycin/OPD; HPLC/DAD):

Dreimal 0.5 ml einer 0.25 M Lösung von D-Glucose, Maltose Monohydrat bzw. Maltotriose, Glycin und OPD werden für unterschiedliche Zeiten (max. 240 min) bei 100 ± 1 °C in zugeschmolzenen Ampullen thermolysiert. Weiteres Vorgehen s. o..

8.3.8 Umsetzung von Fructosglycin im wässrigen Milieu (0,25 M; Fructosglycin/OPD; HPLC/DAD):

Dreimal 0.5 ml einer 0.25 M Lösung von Fructosglycin und OPD werden für maximal 240 min bei 100 ± 1 °C in zugeschmolzenen Ampullen thermolysiert. Weiteres Vorgehen s. o..

8.3.9 Caramelisierung von Dextrin 10 im wässrigen Milieu (Dextrin 10/OPD; HPLC/DAD):

Es wird eine Lösung aus 25 mmol (0,271 g) OPD und 1,877 g Dextrin 10 in 10 ml bidestilliertem Wasser hergestellt.

Dreimal 0.5 ml dieser Lösung werden für unterschiedliche Zeiten (max. 240 min) bei 100 ± 1 °C in zugeschmolzenen Ampullen thermolysiert. Nach der Thermolyse werden die Proben vereinigt, gegebenenfalls mit Methanol verdünnt und mittels HPLC analysiert.

8.3.10 Maillard-Reaktion von Dextrin 10 im wässrigen Milieu (Dextrin 10/Glycin/OPD; HPLC/DAD):

Es wird eine Lösung aus 25 mmol (0,1877 g) Glycin 25 mmol (0,271 g) OPD und 1,877 g Dextrin 10 in 10 ml bidestilliertem Wasser hergestellt.

Dreimal 0.5 ml dieser Lösung werden für unterschiedliche Zeiten (max. 240 min) bei 100 ± 1 °C in zugeschmolzenen Ampullen thermolysiert. Nach der Thermolyse werden die Proben vereinigt, gegebenenfalls mit Methanol verdünnt und mittels HPLC analysiert.

8.4 Furosinbestimmung

1 mmol D-Glucose bzw. Maltose Monohydrat und 1 mmol boc-Lysin werden innig gemischt und bis zu 90 min bei 120 ± 1 °C in verschlossenen Ampullen thermolysiert. Die Thermolysate werden in 10 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

2 ml Reaktionsgemisch werden mit 6 ml 10.6 M HCl in einem fest verschließbaren Reaktionsgefäß gemischt, die Mischung wird 2 min mit Stickstoff gespült und dann 23 h bei 110 °C erhitzt (nach der ersten Stunde werden die Proben kurz geschüttelt). Nach der Hitzebehandlung wird ein Aliquot zentrifugiert und 1 ml des Überstandes über eine Sep-Pack-Kartusche (aktiviert mit 5 ml Methanol, 10 ml Wasser) gegeben, zusätzliches Eluieren mit 4 ml 3 M HCl stellt sicher, dass das gesamte Furosin von der Kartusche eluiert ist.

Die Quantifizierung erfolgt mittels HPLC/Fluoreszenzmessung s. 9.1.9.

9 Literaturverzeichnis

- Acquistucci, R., Panfili, G., Marconi, E. (1996) Application of the Microwave Hydrolysis to Furosine Determination in Cereal and Dairy Foods. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 3855-3857.
- Avigad, G., England, S., Listokowshi, I. (1970) Evaluation of the proportion of the keto form of D-fructose and related 2-ketohexoses present in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* **14**, 365-373.
- Baltes, W. (1980) Die Bedeutung der Maillardreaktion für die Aromabildung in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie.* **34**, 39-47.
- Baltes, W. (1980) Reaktionen vom Maillard-Typ in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie u. gerichtl. Chemie.* **40**, 49-54.
- Baltes, W. (1995) Lebensmittelchemie, Springer-Verlag Berlin.
- Beck, J.; Ledl, F.; Severin, T. (1988) Formation of 1-deoxy-D-erythro-2,3-hexodiulose from Amadori compounds. *Carbohydrate Research.* **177**, 240-243.
- Belitz, H.- D. und Grosch, W. (1992) Lehrbuch der Lebensmittelchemie. Springer- Verlag Berlin, Heidelberg.
- van Boekel, M.A.I.S. (1996) Kinetic modelling of sugar reactions in heated milk-like systems. *Netherlands Milk & Dairy Journal.* **50**, 245-266.
- Buera, M. D. P., Chirife, J., Resnik, S. L., Wetzler, G. (1987a) Nonenzymatic Browning in Liquid Model Systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Maillard Reaction Between Different Single Sugars and Glycine and Comparison with Caramelization Browning. *Journal of Food Science.* **52**, 1063-1067.
- Buera, M. D. P., Chirife, J., Resnik, S. L., Lozano, R. D. (1987b) Nonenzymatic Browning in Liquid Model Systems of High Water Activity: Kinetics of Color Changes due to Caramelization of Various Single Sugars. *Journal of Food Science.* **52**, 1059-1062.
- Cämmerer, B. und Kroh, L.W. (1995) Investigation of the influence of reaction conditions on the elementary composition of melanoidines. *Food Chem.* **53**, 55-59.
- Cämmerer, B., Wedzicha, B. L., Kroh, L. W. (1999) Nonenzymatic browning reaction of retro-aldol degradation products of carbohydrates. *Eur. Food Res. Techn.* **209**, 261-265.

- Cockman, M., Kubler, D. G., Oswald, A. S., Wilson, L. (1987) The mutarotation of fructose and the invertase hydrolysis of sucrose. *Jour. Carb. Chem.* **6**, 181-201.
- Eichner, K. und Karel, M. (1972) The Influence of Water Content and Water Activity on the Sugar-Amino Browning Reaction in Model Systems Under Various Conditions. *J. Agr. Food Chem.* **20**, 218-223.
- Estendorfer, S. Ledl, F, Serverin, T. (1990) Bildung eines Aminoreduktions aus D-Glucose. *Angew. Chem.* **102**, 547-548.
- Feather, M. S.; Mossine, V.; Hirsch, J. (1996) The Use of Aminoguanidine To Trap and Measure Dicarbonyl Intermediates Produced During the Maillard Reaction In *Chemical Markers for Processed and Stored Foods. ACS SS 631*. Eds. Lee T.-C.; Kim, H.-J.; American Chemical Society. Washington DC.
- Glomb, M. A. und Nagaraj, R. H. (1998) Protein Modifications by Glyoxal and Methylglyoxal During the Maillard Reaction of Higher Sugars in The Maillard Reaction in Foods and Medicine. eds. O'Brien, J., Nursten, H. E., Crabbe, J. C., Ames, J. M., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 250-255.
- Glomb, M. A. und Pfahler, C. (1999) Synthese eines bedeutenden Maillard-Intermediats beim Abbau von Hexosen. *Lebensmittelchemie.*, **53**, 16-17.
- Hayase, F., Konishi, H., Kato, H. (1995) Identification of the Modified Structure of Arginine Residues in Proteins with 3-Deoxyglucosone, a Maillard Reaction Intermediate. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1407-1411.
- Hayashi, T. und Namiki, M (1981) On the Mechanism of Free Radical Formation during Browning Reaction of Sugars with Amino Compounds. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 933-939.
- Hayashi, T., Mase, S., Namiki, M. (1985) Formation of N,N'- dialkylpyrazine cation radical from glyoxal dialkylimine produced on reaction of a sugar with an amine or amino acid. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3131- 3137.
- Hayashi, T., Mase, S., Namiki, M. (1986a) Formation of Three- carbon Sugar Fragment at an Early Stage of the Browning Reaction of Sugar with Amines or Amino Acids. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1959- 1964.

- Hayashi, T. und Namiki, M. (1986b) Role of Sugar Fragmentation in an Early Stage Browning of Amino- carbonyl Reaction of Sugar with Amino Acid. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 1965- 1970.
- Häsel, J.; Kroh, L. W. (1998) Nonvolatile reaction products of heat-induced degradation of α -glucans; Part II: Analysis of short- chain α -glucans by gas chromatography/mass spectrometry. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*, **207**, 44-49.
- Häsel, J. (2000) Nichtflüchtige, polare Verbindungen des thermisch induzierten Abbaus von α -Glucanen. Diss. TU Berlin.
- Heyns, K., Breuer, H., Paulsen, H. (1957) Darstellung und Verhalten der 2-N-Aminosäure-2-Desoxy-Glucose („Glucose-Aminosäure“) aus Glycin, Alanin, Leucin und D-Fructose. *Chem. Ber.* **90**, 1374-1386.
- Hirsch, J. und Feather, M. S. (1994) Aminoguanidine as an Inhibitor of the Maillard Reaction in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 325-328.
- Hodge, J. E. (1953) Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928-943.
- Hodge, J. E. und Nelson, E. C. (1961) Preparation and Properties of Galactosyl isomaltol and Isomaltol. *Cereal Chem.* **38**, 207-221.
- Hodge, J. E. (1967) Origin of Flavour in Food. Nonenzymatic browning reactions. In *Chemistry and Physiology of Flavours*. AVI, Westport, Connecticut,.
- Hofmann, T. (1998) Characterization of precursors and elucidation of the reaction pathway leading to a novel coloured 2H,7H,8aH-pyrano[2,3-b]pyran-3-one from pentoses by quantitative studies and application of ^{13}C -labelling experiments. *Carbohydr. Res.* **313**, 215-224.
- Hofmann, T. (1999) Quantitative studies on the role of browning precursors in the Maillard reaction of pentoses and hexoses with L-alanine. *Eur. Food Res. Technol.* **209**, 113-121.
- Hofmann, T. und Heuberger, S. (1999) The contribution of coloured Maillard reaction products to the total colour of browned glucose/L-alanine solutions and studies on their formation. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **208**, 17-26.

- Hofmann, T., Bors, W., Stettmaier, K. (1999) Radical-Assisted Melanoidine Formation during Thermal Processing of Foods as well as under Physiological Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 391-396.
- Huber, B. und Ledl, F. (1990) Formation of 1-amino-1,4-dideoxy-2,3-hexodiuloses and 2-aminoacetylfurans in the Maillard reaction. *Carbohydrate Research.* **204**, 215-220.
- Huyghues-Despointes, A. und Yaylayan, V. A. (1996) Retro-Aldol and Redox Reactions of Amadori Compounds: Mechanistic Studies with Variouslly Labeled D-[¹³C]Glucose. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 672- 681.
- Ito, H. (1977) The Formation of Maltol and Isomaltol through Degradation of Sucrose. *Agric. Biol. Chem.* **41(7)**, 1307-1308.
- Jurch, G. R. und Tatum, J. H. (1970) Degradation of D-Glucose with Acetic Acid and Methylamine. *Carbohydr. Res.* **15**, 233-239.
- Kato, H., Yamamoto, M., Fujimaki, M., (1969) Mechanisms of Browning Degradation of D-Fructose in special comparison with D-Glucose-Glycine Reaction. *Agric. Biol. Chem.* **33**, 939-948.
- Kawakishi, S., Cheng, R. Z., Sato, S, Uchida, K. (1994) Biomimic Oxidation of in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 235-243.
- Kim, M.-O. (1994) Reaktionen ausgesuchter Zuckerabbauprodukte unter Maillard Bedingungen. Dissertation, Berlin.
- Kocienski, P. J. (1994) Protecting Groups. *Georg Thieme Verlag Stuttgart- New York.* 192-194.
- Knecht, K. J., Feather, M. S., Baynes, J. W. (1992) Detection of 3-Deoxyfructose and 3-Deoxyglucosone in Human Urine and Plasma: Evidence of Intermediate Stages of the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 130-137.
- Konishi, Y., Hayase, F., Kato, H. (1994) Novel Imidazolone Compound Formed by the Advanced Maillard Reaction of 3-Deoxyglucosone and Arginine Residues in Protein. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1953-1955.
- Kramhöller, B., Pischetsrieder, M., Severin, T. (1993) Maillard reactions of dextrans and starch. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **197**, 227-229.
- Kroh, L. W. (1994) Caramelisation in food and beverage. *Food Chemistry.* **51**, 373-379.

- Kroh, L.W.; Jalyschko, W.; Häsel, J. Non-volatile Reaction Products by Heat-induced Degradation of α -Glucans. Part I: Analysis of oligomeric Maltodextrins and Anhydrosugars. *Starch/ Stärke*. **1996**, *48*, 426-433.
- Labuza, T. P. und Saltmarch, M. (1981) The nonenzymatic browning reaction as affected by water in foods in Water Activity: Influences on Food Quality. Eds. Rockland L. B. und Stewart, G. F. Academic Press, NewYork, 605-650.
- Lal, S., Szwergold, B. S., Taylor, A. H., Randall, Kappler, F., Brown, T. R. (1995) Production of D-Fructose and D-Fructose-3-Phosphate in Maturing Rat Lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 969-973.
- Ledl, F., Fritsch, G., Hiebl, J., Pachmayer, O., Severin, T. (1986) in „Amino-Carbonyl Reaction in Food and Biological Systems“-Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaktion. Kodansha Ltd., Tokyo.
- Ledl, F. (1987) Analytik flüchtiger Zuckerabbauprodukte. *Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem.* **41**, 83-87.
- Ledl, F. (1990) Chemical Pathways of the Maillard Reaction. In ,The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology, P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrell and R. Liardon (eds.) Birkhauser Verlag, Basel, 19-42.
- Ledl, F. und Fritsch (1984) Bildung von Pyrrolinonreduktionen beim Erhitzen von Hexosen mit Aminosäuren. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **178**, 41-44.
- Ledl, F. und Schleicher, E. (1990) Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper- neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **102**, 597-626.
- Liedke, R., Eichner, K. (1998) Bildung von D-arabino-Hexosulose beim Abbau von Amadori-Verbindungen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen. *Lebensmittelchemie.* **53**, 18-19.
- Maillard, L. C. (1912a) Action des acides aminés sur les sucres; formation des melanoidins par voie methodique. *C. R. Acad. Sci. Ser.* **154**, 66-68?
- Mauron, J. (1981) The Maillard reaction in food: A critical review from the nutritional standpoint. *Progr. Food Sci.* **5**, 5-35.
- Monnier, V. M. und Sell, D. R. (1994) The Advanced Maillard Reaction in Ageing and Age-related Diseases Probed by Pentosidine in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 235-243.

- Morita, N., Inoue, K., Takagi, M. (1981) Quinoxalines derived from D-glucose and o-phenylenediamine in a weakly acidic medium. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 2665-2888.
- Morita, N., Inoue, K., Takagi, M. (1985) Quinoxalines derived from disaccharides and o-phenylenediamine in a weakly acidic reflux condition. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3279-3289.
- Namiki, M. (1988) Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Adv. Food. Res.* **32**, 115-184.
- Nedvidek, W. (1992a) Zuckerabbauprodukte mit α -Dicarbonylstruktur. Thesis. Stuttgart,
- Nedvidek, W.; Ledl, F.; Fischer, P. (1992b) 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.
- Nicoli, M. C., Anese, M., Parpinel, M. T., Franceschi, S., Lericci, C. R. (1997) Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Letters.* **114**, 71-74.
- Pokorny, J., Pilkova, L., Davidek, J., Valentova, H. (1988) Effect of Amadori rearrangement products on the non-enzymatic browning in model systems. *Die Nahrung.* **32**, 767-776.
- Organikum, (1990) 18. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, S. 224.
- Othwerth, B. J., Speaker, J. A., Prabhakaram, M. (1994) in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 292-304.
- Patton, S. (1950) The Formation of Maltol in Certain Carbohydrate-Glycine-Systems. *J. Biol. Chem.* **184**, 131-134.
- Pischetsrieder, M. und Schmidt, A. M. (1998) The Maillard Reaction in Food Chemistry and Medicine-Identification of New Products and their Receptor Binding. *G.I.T.* **3**, 164-168.
- Pischetsrieder, M.; Schoetter, C.; Severin, T. (1998a) Formation of an Aminoreductone during the Maillard Reaction of Lactose with N^α-Acetyllysine or Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 928-931.

- Pischetsrieder, M., Rinaldi, F., Gross, U., Severin, T. (1998b) Assessment of the Autoxidative and Prooxidative Activities of Two Aminoreductones Formed during the Maillard Reaction: Effects on the Oxidation of β -Carotene, N-Acetylhistidine and cis-Alkenes. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 2945-2950.
- Ponder, G. R. und Richards G. N. (1993) Pyrolysis of inulin, glucose, and fructose. *Carbohydrate Research.* **244**, 341- 359.
- Resmini, P. und Pellegrino, L. (1991) Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *International Chromatography Laboratory.* **6**, 7-11.
- Resmini, P. Pellegrino, L., Battelli, G. (1990) Accurate Quantification of Furosine in Milk and dairy Products by a Direct HPLC Method. *Ital. J. Food. Sci.* **3**, 173-183.
- Schmidt, A. M. und Ster, D. M. (1994) in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 262-266.
- Shallenberger, R. S. und Birch, G. G. (1975) in Sugar Chemistry. AVI Publ. Co. Inc., Westport, Conn. 89-112.
- Skog, K. und Jagerstad, M. (1994) in Maillard Reactions in Chemistry, Food, and Health. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'Brien, J., Baynes, J.W., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 147-152.
- Spark, A. A. (1969) Role of amino acids in nonenzymatic browning. *J. Sci. Food Agric.* **20**, 308-316.
- Steber, F. (1987) Beurteilung der Wärmebehandlung von Konfitüren und Fruchtzubereitungen auf Grund chemischer Kennzahlen insbesondere des Gehaltes an Hydroxymethylfurfural, TU München.
- Suarez, G., Etlinger, D. J., Maturana, J., Weitman, D. (1995) Fructated protein is more resistant to ATP-dependent proteolysis than glucated protein possibly as result of higher content of Maillard fluorophores. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 209-213.
- Swenson, C. A. und Barker, R. (1971) Proportion of keto and aldehyde forms in solutions of sugars and sugarphosphates. *Biochem.* **10**, 3151-3154.
- Szwergold, B. S., Kappler, F., Brown, T. R. (1990) Identification of D-Fructose-3-Phosphate in the lens of diabetic rat. *Science* **247**, 451-454.
- Tressl, R., Wondrak, G. T., Garbe, L.-A., Krüger, R.-P., Rewicki, D. (1998) Pentoses and Hexoses as Sources of New Melanoidin-like Maillard Polymers. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1765-1776.

- Tschiersky, H. (1988) Strukturuntersuchungen an gebrannten Zuckern (Karamel). Diss., TU Berlin
- Tschiersky, H. und Baltes, W. (1989) Untersuchungen an Caramel. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **189**, 132-137.
- Wedzicha, B. L.; Kedward C. (1995) Kinetics of the oligosaccharides-glycine-sulphite reaction: relationship to the browning of oligosaccharide mixtures. *Food Chemistry.* **54**, 397-402.
- Weenen, H., Tjan, S. B., de Valois, P. J., Bouter, N., Pos, A., Vonk, H. (1993) in „Thermally Generated Flavors“ eds. Parliment, T., Morello, M. J. und McGorin, R. J., American Chemical Society, Washington, D. C. 142-157.
- Weenen, H., Apeldoorn, W. (1996) Carbohydrate Cleavage in the Maillard Reaction. in *Flavour Science*, Taylor, A. J. and Mottram, D. S. eds. Royal Society of Chemistry, Cambridge. 211-216.
- Weenen, H. (1998) Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chemistry.* **62**, 393-401.
- Westphal, G., Kroh, L. W., Sandner, E. (1981) Untersuchungen zur Maillard-Reaktion. 3. Mitt. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchungen nichtflüchtiger Produkte der Reaktion zwischen D-Glucose und Thioharnstoff. *Nahrung* **25**, 893-903.
- Westphal, G. und Kroh, L. W. (1985a) Zum Mechanismus der „frühen Phase“ der Maillard-Reaktion 1. Mitt. Einfluss der Struktur des Kohlenhydrats und der Aminosäure auf die Bildung des N-Glycosids. *Nahrung.* **29**, 757-764.
- Westphal, G. und Kroh, L. W. (1985b) Zum Mechanismus der „frühen Phase“ der Maillard-Reaktion 2. Mitt. Folgereaktionen von N-Glycosiden. *Nahrung.* **29**, 764-775.
- Wertz, P. W., Garver, J. C., Anderson, L. (1981) Anatomy of a complex mutarotation. Kinetics of tautomerization of α -D-galactopyranose and β -D-galactopyranose in water. *Jour. Am. Chem. Soc.* **103**, 3916-3922.
- Weygand, F., Simon, H., Bitterlich, W., Hodge, J. E., Fisher, B. E. (1958) Structure of Piperidino-Hexose-Reductone. *Tetrahedron.* **6**, 123-138.
- Wong, D. W. S. (1989) Mechanism and theory food chemistry. Van Nostrand Reinhold. New York, 113-120.

10 Anhang

NMR-Daten vom Chinoxalin des Glucosons

s. 8.1.10.

^1H in DMSO

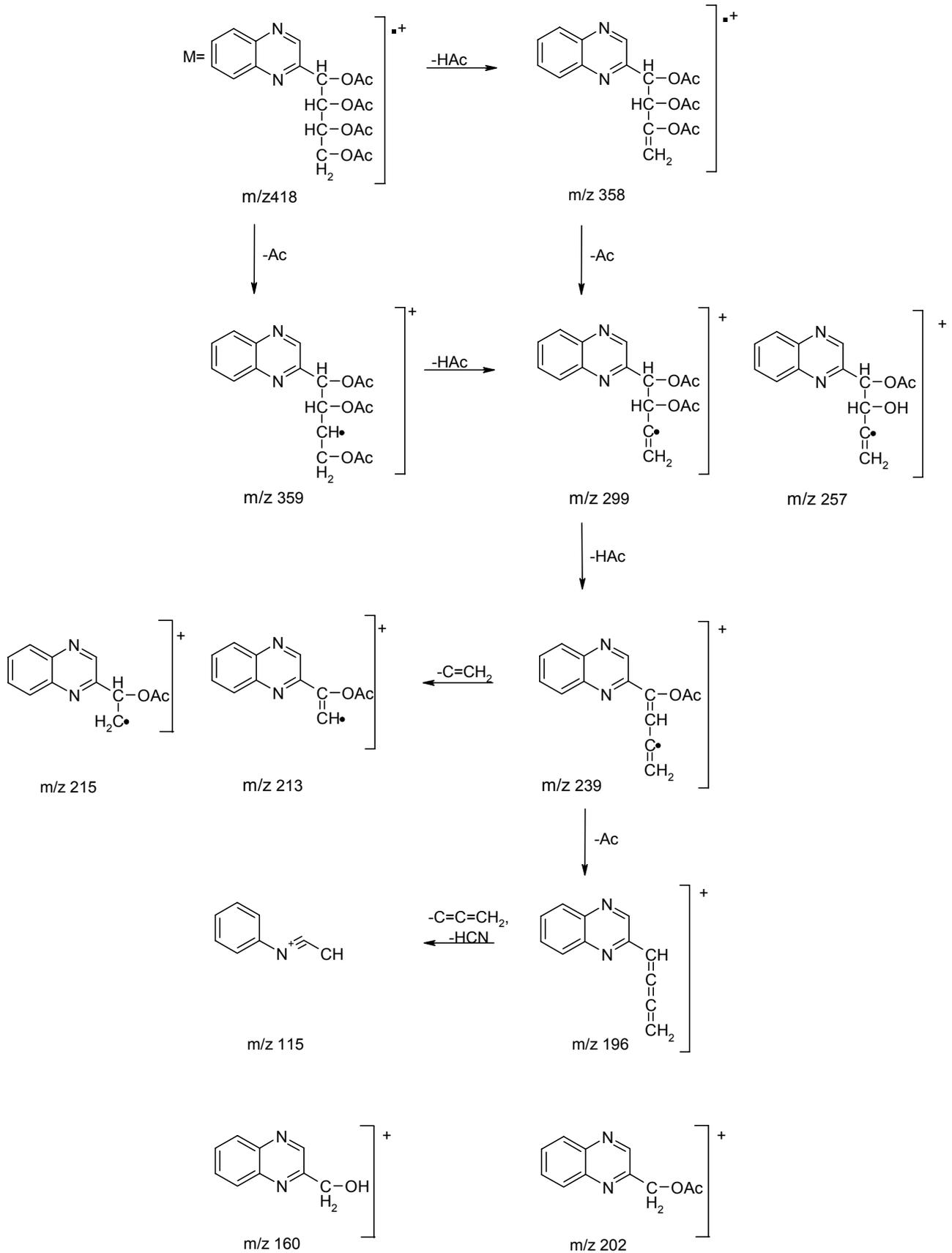
Verschiebung in ppm	Kopplungsart	Koppl.-konst. in J	Summe H	Zuordnung
3,34	singulett		4	-OH
3,66	duplett, duplett	14,1; 3,2	1	CH ₂ OH-CHOH-
4,65	multiplett		1	-CHOH-CHOH-CH ₂ OH
5,14	duplett	6,1	1	CHOH-CHOH-CHOH
5,59	duplett,	6,0	1	Aryl-CHOH-CHOH
7,80	multiplett		2	H _{aromat.}
8,05	multiplett		2	H _{aromat}
9,08	singulett		1	H _{heteroaromat.}

300 MHz

^{13}C in DMSO

Verschiebung in ppm	Anzahl C	Zuordnung
63,48	1	-CH ₂ OH
71,18	1	-CHOH-
73,19	1	-CHOH-
74,29	1	Aryl-CHOH-CHOH
128,58	1	aromat
128,85	1	aromat.
129,25	1	aromat
129,95	1	aromat.
140,81	1	heteroaromat.
140,95	1	heteroaromat.
145,21	1	heteroaromat.
159,45	1	heteroaromat.

MS-Interpretation/Fragmentierungsmuster vom acetylierten Chinoxalin der Glucoson; (GC/MS s. 8.1.5.)



NMR-Daten vom Chinoxalin der 3-Desoxyhexosulose

s. 8.1.10.

^1H in CD_3OD

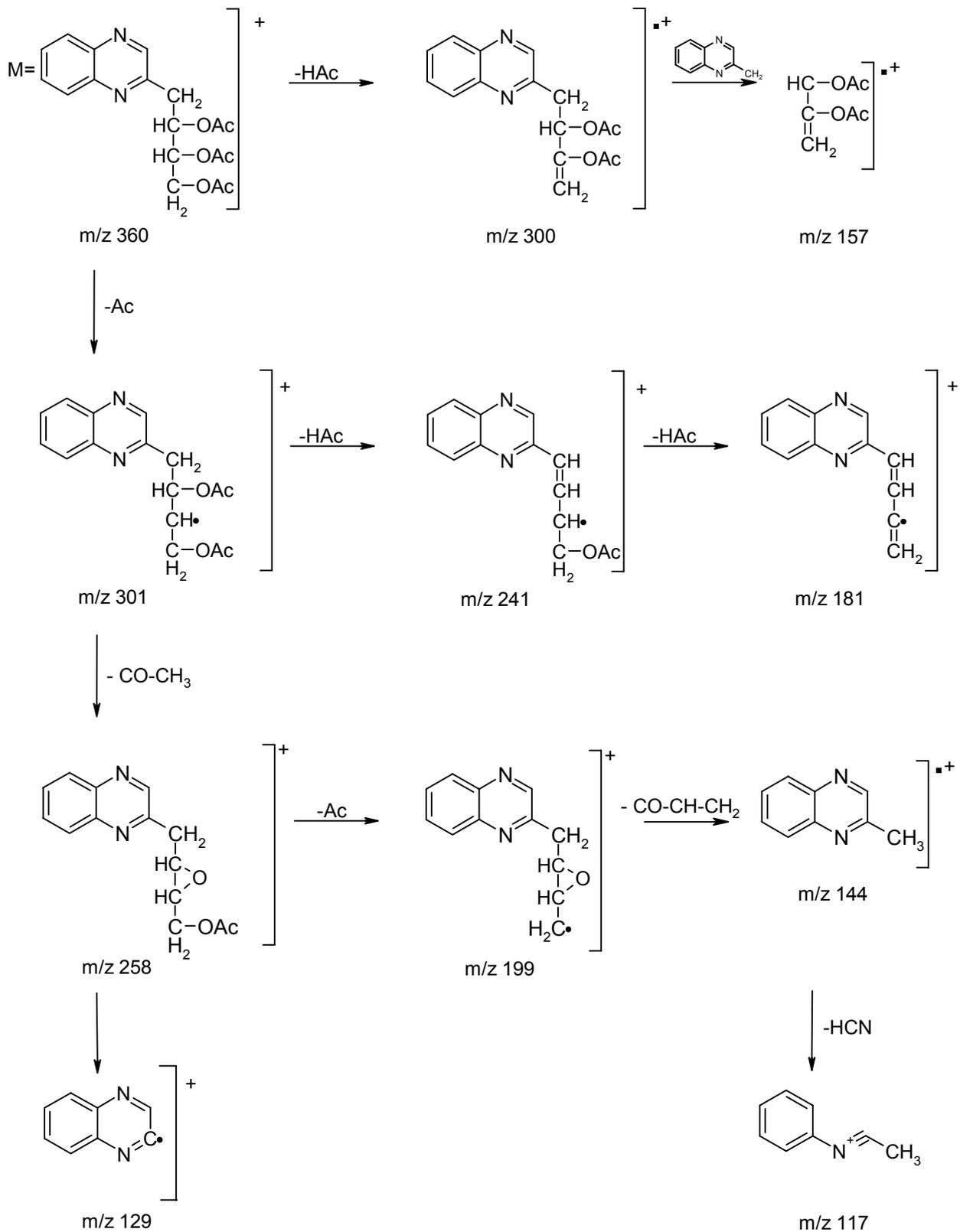
Verschiebung in ppm	Kopplungsart	Koppl.konst. in J	Summe H	Zuordnung
3,13	duplett, duplett	14,1; 9,4	1	-CHH-CHOH-
3,42	duplett, duplett	14,1; 3,2	1	-CHH-CHOH-
3,60	multipllett		1	-CHOH-CHOH-CH ₂ OH
3,66	duplett, duplett	5,8; 10	1	-CHOH-CHHOH
3,80	duplett, duplett	10,2; 2,8	1	-CHOH- CHHOH
4,09	multipllett		1	CH ₂ -CHOH-CHOH
7,77	multipllett		2	H _{aromat.}
8,03	multipllett		2	H _{aromat}
8.83	singulett		1	H _{heteroaromat.}

300 MHz

^{13}C in CD_3OD

Verschiebung in ppm	Anzahl C	Zuordnung
40,76	1	-CH ₂ -
64,68	1	-CH ₂ OH
73,19	1	CH ₂ OH-CHOH-
76,35	1	CHOH-CHOH-CHOH
129,56	1	aromat
129,68	1	aromat.
130,66	1	aromat
131,46	1	aromat.
142,11	1	heteroaromat.
143,21	1	heteroaromat.
148,14	1	heteroaromat.
157,61	1	heteroaromat.

MS-Interpretation/Fragmentierungsmuster vom acetylierten Chinoxalin der 3-Desoxyhexosulose; (GC/MS s. 8.1.5)



NMR-Daten vom Chinoxalin der 1-Desoxyhexosulose

s. 8.1.10.

^1H in CD_3OD

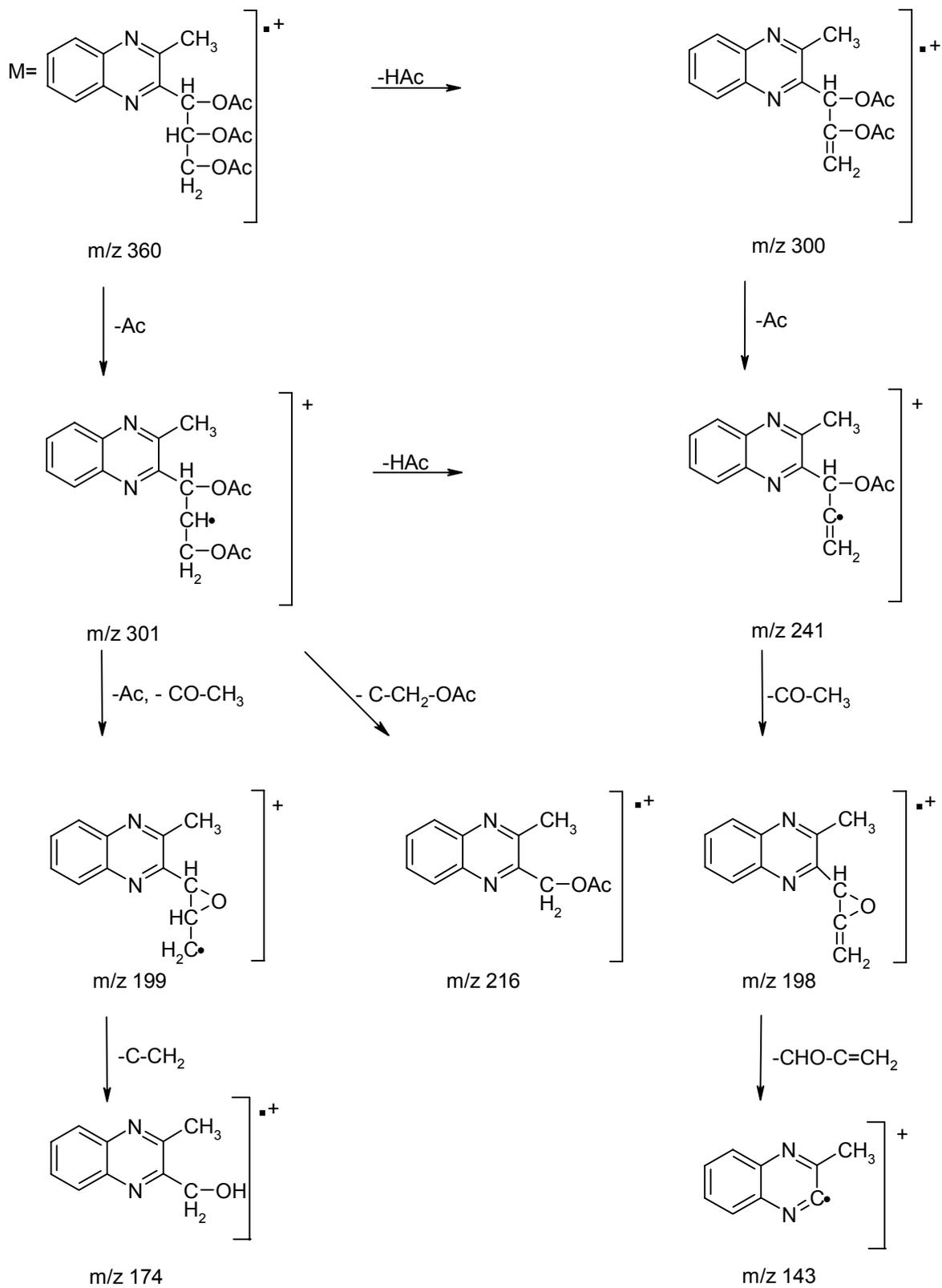
Verschiebung	Kopplungsart	Koppl.konst. in J	Summe H	Zuordnung
2,85	singulett	-	3	C- CH_3
3,85	duplett, duplett	5,4; 11,5	1	CHOH- CHHOH
3,93	duplett, duplett	3,2; 11,4	1	CHOH- CHHOH
4,09	multipllett		1	CHOH- CHOH-
5,95	duplett	8	1	Aryl- CHOH-C
7,74	multipllett	-	2	$H_{\text{aromat.}}$
7,96	multipllett	-	1	$H_{\text{aromat.}}$
8,07	multipllett	-	1	$H_{\text{aromat.}}$

300 MHz

^{13}C in CD_3OD

Verschiebung	Anzahl C	Zuordnung
23	1	- CH_3
64,8	1	- CH_2OH
72	1	$\text{CH}_2\text{OH-CHOH-}$
76,3	1	Aryl- CHOH-
128	1	aromat
129	1	aromat.
130	1	aromat
131	1	aromat.
142	1	heteroaromat.
142	1	heteroaromat.
154,5	1	heteroaromat.
157	1	heteroaromat.

MS-Interpretation/Fragmentierungsmuster vom acetylierten Chinoxalin der 1-Desoxyhexosulose; (GC/MS s. 8.1.5)



NMR-Daten vom Chinoxalin der 3- Desoxypentosulose

s. 8.1.10.

^1H in CD_3OD

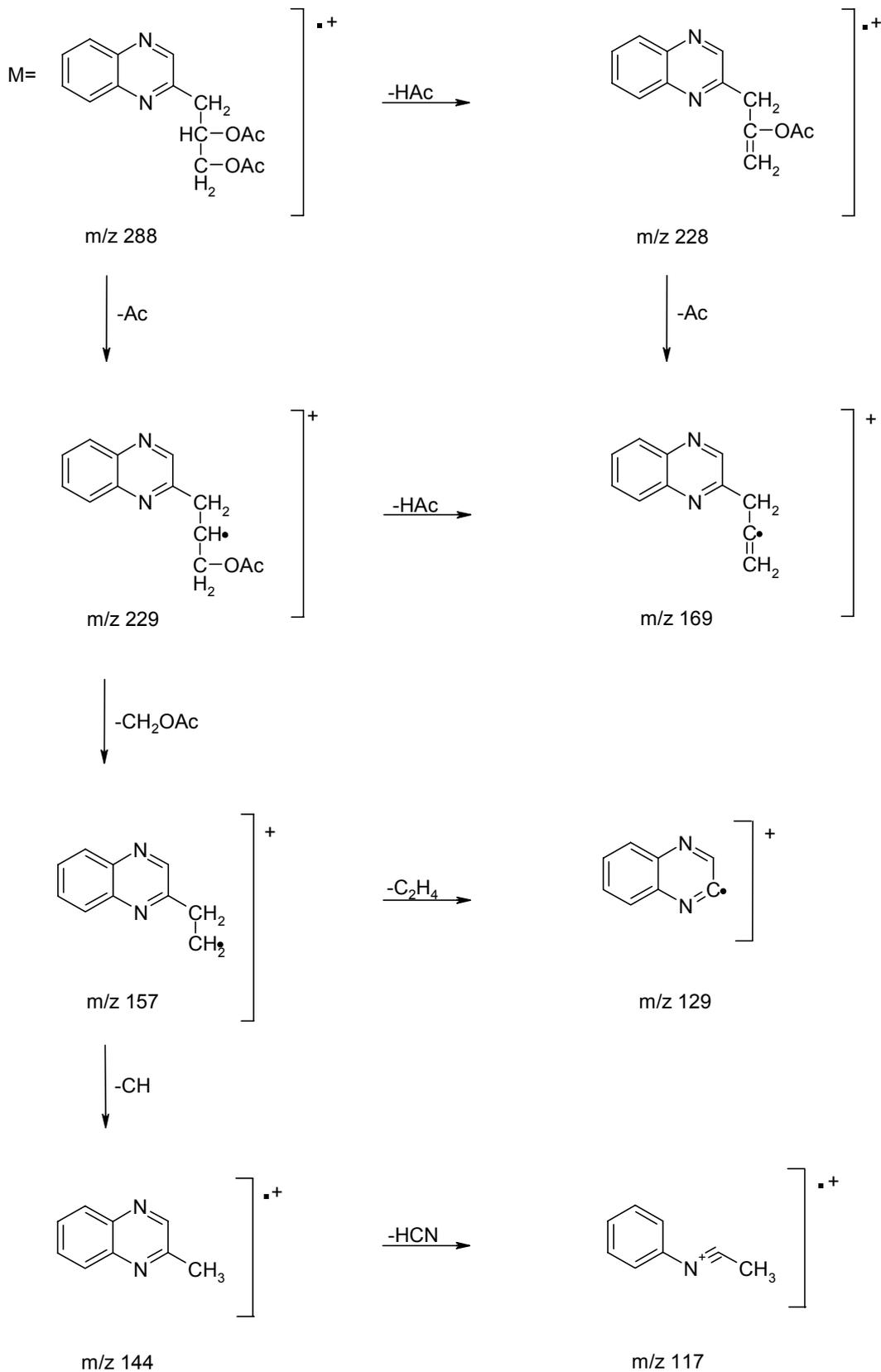
Verschiebung	Kopplungsart	Koppl.konst. in J	Summe H	Zuordnung
3,09	duplett, duplett	14,0; 8,7	1	Aryl- <i>CHH</i> -CHOH
3,24	duplett, duplett	14,0; 4,2	1	Aryl- <i>CHH</i> -CHOH
3,61	duplett, duplett	5,02 (5,74) 1,1 (1,84)	2	-CHOH- <i>CH</i> ₂ OH
4,15	multipllett		1	<i>CH</i> ₂ -CHOH- <i>CH</i> ₂ OH
7,76	multipllett		2	H _{aromat.}
8,02	multipllett		2	H _{aromat.}
8,83	singlett		1	H _{heteroaromat.}

300 MHz

^{13}C in CD_3OD

Verschiebung	Anzahl C	Zuordnung
41,05	1	- <i>CH</i> ₂ -
67,07	1	- <i>CH</i> ₂ OH
72,90	1	-CHOH-
129,5	1	C _{aromat.}
129,62	1	C _{aromat.}
130,65	1	C _{aromat.}
131,4	1	C _{aromat.}
142,0	1	C _{heteroaromat.}
143,18	1	C _{heteroaromat.}
147,9	1	C _{heteroaromat.}
156,97	1	C _{heteroaromat.}

MS-Interpretation/Fragmentierungsmuster vom acetylierten Chinoxalin der 3-Desoxypentose; (GC/MS s. 8.1.5)



NMR-Daten vom Chinoxalin der 1,4-Didesoxyhexosulose

s. 8.1.10.

^1H in CD_3OD

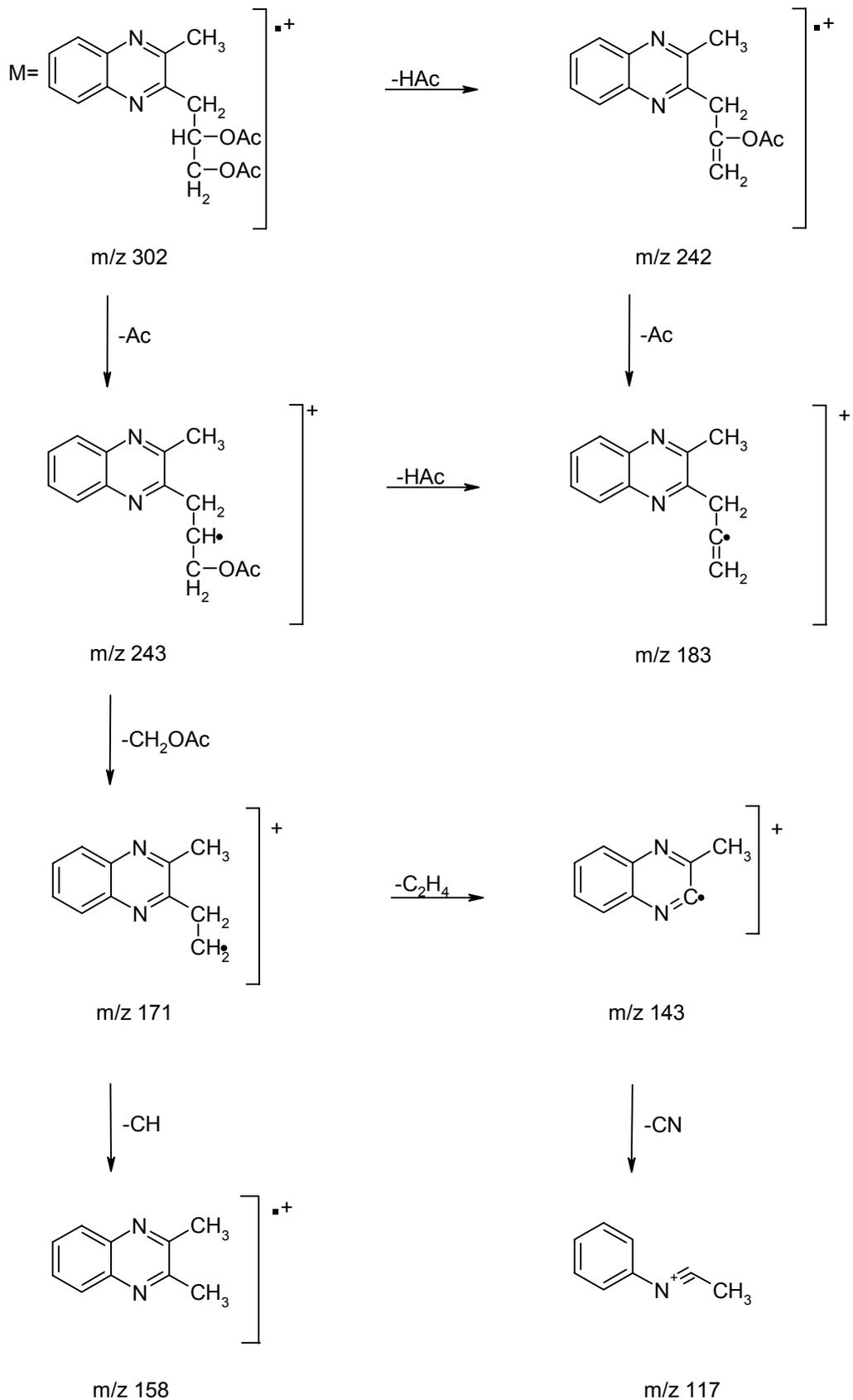
Verschiebung	Kopplungsart	Koppl.konst. in J	Summe H	Zuordnung
2,77	singulett	-	3	C- CH_3
3,17	multipllett		2	CH ₂ OH-CH
3,65	duplett	5,3	2	Aryl- CH_2 -CHOH
4,30	multipllett		1	CH ₂ -CHOH-CH ₂ OH
7,70	multipllett	-	2	$H_{\text{aromat.}}$
7,94	multipllett	-	2	$H_{\text{aromat.}}$

400 MHz

^{13}C in CD_3OD

Verschiebung	Anzahl C	Zuordnung
22,99	1	- CH_3
39,86	1	Aryl- CH_2 -CHOH-
67,12	1	CH ₂ OH-CHOH-
72,57	1	CH ₂ -CHOH-
128,74	1	aromat
129,27	1	aromat.
130,32	1	aromat
130,55	1	aromat.
141,64	1	heteroaromat.
142,03	1	heteroaromat.
155,70	1	heteroaromat.
157,63	1	heteroaromat.

MS-Interpretation/Fragmentierungsmuster vom acetylierten Chinoxalin der 1,4-Dideoxyhexosulose; (GC/MS s. 8.1.5)



Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 01	Bildung des Amadoriproduktes über das N-Glycosid (Die folgenden Reaktionsschemata zeigen vereinfachend die Hexosen in der offenkettigen Form. Tatsächlich liegen die Zucker und ihre Abbauprodukte jedoch in der cyclischen Halbacetalform vor.)	6
Abb. 02	Strecker-Abbau nach Belitz und Grosch (1992)	7
Abb. 03	Bildung von Hydroxymethylfurfural (HMF) aus D-Glucose (nach Baltes, 1995)	8
Abb. 04	Bildung von Anhydrozuckern und Transglycosidierungsprodukten über das Glycosylkation aus α -Glucanen (R= H, α -Glucan; nach Kroh et al., 1996)	10
Abb. 05	Bildung von 3-Desoxyhexosulose durch vinyloge β -Eliminierung	11
Abb. 06	Schematische Darstellung der Bildung von Desoxyhexosulosen R= H, Saccharid (β -Elim. = vinyloge β -Eliminierung)	12
Abb. 07	Autoxidativer Abbauweg der Amadori-Verbindung (Liedke und Eichner, 1998)	13
Abb. 08	Basenkatalysierte Retro-Aldolreaktion von D-Glucose und Bildung von Glyoxal in Anlehnung an Hayashi et al. (1985) (RA= Retro-Aldolreaktion; Keto-Enol.=Keto-Enol-Tautomerisierung)	14
Abb. 09	Retro-Aldolreaktion des aminierten Amadoriproduktes (Hayashi et al., 1986) (Retro-Aldol.= Retro-Aldolreaktion; β -Elim. = vinyloge β -Eliminierung)	15
Abb. 10	Retro-Aldolreaktion von 1-Desoxyhexosulose (Keto-Enol.= Keto-Enol-Tautomerisierung, weitere Abkürzungen s. Abb. 08)	15
Abb. 11	Bildung von Methylglyoxal aus γ -Pyranon (Kim, 1994) (α -Dicarb.spaltung= α -Dicarbonylspaltung; weitere Abkürzungen s. Abb. 08 und 09)	16
Abb. 12	Bildung von Diacetyl aus 1-Desoxyhexosulose (Weenen, 1996) (Abkürzungen s. Abb. 08 und 09)	17

Abb. 13	Bildung von Diacetyl aus 1-Desoxyhexosulose in Anlehnung an Kim (1994) (Red. = Reduktion, weitere Abkürzungen s. Abb. 08 und 09)	17
Abb. 14	Bicyclische Strukturen der 3-Desoxyhexosulose (Weenen, 1998)	18
Abb. 15	Bildung von Folgeprodukten der Desoxyhexosulosen	20
Abb. 16	Struktur des Melanoidins nach Cämmerer und Kroh (1995) R= H oder Kohlenhydrat, R'= Seitenkette von Aminosäuren	22
Abb. 17	Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) am Beispiel von Diacetyl	23
Abb. 18	Abfangreaktion mit Aminoguanidin am Beispiel von Diacetyl (Hirsch und Feather, 1994)	24
Abb. 19	Bräunung von D-Glucose/Glycin/OPD (Glc/Gly/OPD) Glycin/OPD (Gly/OPD) und D-Glucose/Glycin (Glc/Gly)	31
Abb. 20	Schema der Fragmentation von D-Glucose und D-Fructose während der nichtenzymatischen Bräunung	33
Abb. 21	Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)	34
Abb. 22	Bildung von Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)	35
Abb. 23	Bildung von Glyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)	36
Abb. 24	Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)	37
Abb. 25	Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (MR)	39

Abb. 26	Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fructose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus D-Fructose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)	40
Abb. 27	Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fructose/OPD (cara.) und aus D-Fructose/Glycin/OPD (MR)	41
Abb. 28	Mögliche Reaktionswege der D-Fructose (schematisch)	42
Abb. 29	Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)	43
Abb. 30	Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltulose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltulose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)	44
Abb. 31	Aminkatalysierte Fragmentierung des Amadori- und des Heynsproduktes von Maltose bzw. Maltulose	45
Abb. 32	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol)	48
Abb. 33	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/OPD (1 mmol: 1 mmol)	49
Abb. 34	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad bei der Caramelisierung unter quasi wasserfreien Bedingungen	52
Abb. 35	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)	54
Abb. 36	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)	55
Abb. 37	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)	57

Abb. 38	Bildung von Fructosglycin aus D-Glucose/Glycin/OPD und von Maltulosglycin aus Maltose/Glycin/OPD in Maillard-Reaktionsmodellen im quasi wasserfreien Milieu	60
Abb. 39	Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad bei der Maillard-Reaktion von Maltose und Maltotriose unter quasi wasserfreien Bedingungen	62
Abb. 40	Vinyloge β -Eliminierung des glycosidischen Restes aus der Endiolstruktur des Maltose-Glycin-Adduktes	64
Abb. 41	Energieminimierte Konfiguration der 2,3-Endiolstruktur des Maltose-Glycin-Adduktes (Alchemy III, Tripos Associates)	65
Abb. 42	Schematischer Reaktionsmechanismus für die Bildung der 1,4-Didesoxyhexosulose in der Maillard-Reaktion aus Oligosacchariden im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu	67
Abb. 43	Schematischer Reaktionsweg für die Bildung von Furosin aus glycosidiertem Lysin	68
Abb. 44	Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Fructosglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)	73
Abb. 45	Abbau von Fructosglycin im quasi wasserfreien Milieu aus Fructosglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)	74
Abb. 46	Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/OPD	78
Abb. 47	Bildung von D-Fructose aus D-Glucose (Glc/OPD) und Maltulose aus Maltose (Mal/OPD) bei der Caramelisierung in wässriger Lösung	80
Abb. 48	Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus D-Glucose/Glycin/OPD	83
Abb. 49	Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/Glycin/OPD	86
Abb. 50	Abnahme der Kohlenhydratkomponente in den Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD), Maltose (Mal/Gly/OPD) und Maltotriose (M3ose/Gly/OPD) in wässriger Lösung	88

Abb. 51	Bildung von Fructosglycin und Maltulosglycin in Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD) bzw. Maltose (Mal/Gly/OPD) in wässriger Lösung	90
Abb. 52	Bildung eines Aminoreduktions aus Oligosacchariden nach Pischetsrieder et al., 1998b)	92
Abb. 53	Vorschlag für die Bildung von 3-Desoxypentose durch intramolekulare Basenkatalyse (Keto-Enol.= Keto-Enol-Tautomerisierung; β -Elim.= vinyloge β -Eliminierung)	94
Abb. 54	Vorschlag für den Abbau von Maltose in der Maillard-Reaktion in wässriger Lösung (Abkürzungen s. Abb.50)	96
Abb. 55	Oxidation des Pentosederivates auf verschiedenen Wegen (Weenen, 1998 und Weenen persönliche Mitteilung, 1999)	97
Abb. 56	Möglichkeiten der Bildung bekannter Maillard-Reaktionsprodukte aus einem Reaktionsprodukt der Retro-Claisen Esterkondensation	98
Abb. 57	Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in wässriger Lösung aus Fructosglycin/OPD (jeweils 0,25 M)	102
Abb. 58	Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,270 g in 10 ml)	105
Abb. 59	Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /Gly/OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,1875 g/0,270 g in 10 ml)	106

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab. 01	Abbau von D-Glucose, Maltose und Maltotriose in Caramelisierungsmodellen in Gegenwart von OPD im quasi wasserfreien Milieu	50
Tab. 02	Abbau von D-Glucose, Maltose und Maltotriose in Maillard-Reaktionsmodellen in Gegenwart von OPD im quasi wasserfreien Milieu	58
Tab. 03	Abbau von D-Glucose (Glc), Maltose (Mal) und Maltotriose (M3ose) in wässriger Lösung (0,25 M) in Anwesenheit von OPD	79
Tab. 04	Bildung von D-Glucose aus Maltose (Mal/OPD) und Maltose aus Maltotriose (M3ose/OPD) während der Caramelisierung in wässriger Lösung in mol%	81
Tab. 05	Bildung von α -Dicarbonylen (detektiert als Chinoxaline) in der Maillard-Reaktion von Maltotriose/Glycin/OPD in wässriger Lösung in mol%	87
Tab. 06	Entstehung von Kohlenhydraten mit niedrigerem Polymerisationsgrad in Maillard-Reaktionsgemischen von Maltose und Maltotriose in wässriger Lösung in mol%	92

Daten zu:

Abb. 19 Bräunung von D-Glucose/Glycin/OPD (Glc/Gly/OPD) Glycin/OPD (Gly/OPD) und D-Glucose/Glycin (Glc/Gly)

Zeit [min]	Absorption ($\lambda = 420$)		
	Glc/Gly/OPD	Gly/OPD	Glc/Gly
0	0,123	0,072	0,004
30	0,266	1,282	0,038
60	0,395	1,851	0,076
90	0,609	2,018	0,165
120	0,835	2,018	0,285
150	0,994	2,155	0,456
180	1,057	2,223	0,724
240	1,281	2,255	1,281
300	1,233	2,285	2,039
360	1,402	2,296	2,49
450	-*	2,305	-

*- keine Messung

Abb. 21 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

Zeit [min]	Methylglyoxal [mol%]		
	Glc/2OPD	Glc/OPD	Glc/Gly/OPD
5	n. d.**	0,025	n. d.
10	0,226	0,149	n. d.
12	n. n.***	n. n.	0,562
15	0,525	0,428	0,583
30	1,217	1,055	2,941
45	1,620	1,446	4,271
60	1,932	1,696	5,065

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 22 Bildung von Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

Zeit [min]	Diacetyl [mol%]		
	Glc/2OPD	Glc/OPD	Glc/Gly/OPD
5	n. d.**	n. d.	n. d.
10	n. d.	n. d.	n. d.
12	n. d.	n. d.	0,023
15	n. d.	n. d.	n. d.
30	0,039	0,031	0,242
45	0,088	0,088	0,453
60	0,085	0,120	0,534

** - nicht detektiert

Abb. 23 Bildung von Glyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 2 mmol; Glc/2OPD), D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; Glc/OPD) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; Glc/Gly/OPD)

Zeit [min]	Glyoxal [mol%]%		
	Glc/2OPD	Glc/OPD	Glc/Gly/OPD
5	n. d.**	0,020	n. d.
10	0,084	0,050	n. d.
12	n. d.	n. d.	0,040
15	0,158	0,082	0,052
30	0,244	0,124	0,150
45	0,231	0,171	0,204
60	0,293	0,200	0,275

** - nicht detektiert

Abb. 24 Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Zeit [min]	α -Dicarbone [mol%]			
	Glyoxal cara.	Glyoxal MR	Diacetyl cara.	Diacetyl MR
5	0,020	n. d.**	n. d.	n. d.
10	0,050	n. d.	n. d.	n. d.
12	n. n.***	0,040	n. d.	0,023
15	0,082	0,052	n. d.	n. n.
30	0,124	0,150	0,031	0,242
45	0,171	0,204	0,088	0,453
60	0,200	0,275	0,120	0,534

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 25 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/OPD (cara.) und aus D-Glucose/Glycin/OPD (MR)

Zeit [min]	Methylglyoxal [mol%]	
	Methylglyoxal cara.	Methylglyoxal MR
5	0,025	n. d.**
10	0,149	n. d.
12	n. n.***	0,562
15	0,428	0,583
30	1,055	2,941
45	1,446	4,271
60	1,696	5,065

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 26 Bildung von Glyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fructose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus D-Fructose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]			
	Glyoxal cara.	Glyoxal MR	Diacetyl cara.	Diacetyl MR
5	n. d.**	0,005	n. d.	n. d.
10	0,027	0,042	n. d.	n. d.
15	n. n.***	0,112	n. d.	n. d.
30	0,094	0,129	n. d.	0,031
45	0,075	0,190	n. d.	0,179
60	0,099	0,212	n. d.	0,252

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 27 Bildung von Methylglyoxal (nachgewiesen als Chinoxalin) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Fructose/OPD (cara.) und aus D-Fructose/Glycin/OPD (MR)

Zeit [min]	Methylglyoxal [mol%]%	
	Methylglyoxal cara.	Methylglyoxal MR
5	n. d.**	0,100
10	0,094	0,292
15	n. n.***	0,818
30	0,553	1,593
45	0,556	2,662
60	0,690	3,506

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 29 Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]					
	Glyoxal cara.	Glyoxal MR	Methylglyoxal cara.	Methylglyoxal MR	Diacetyl cara.	Diacetyl MR
0	0	0	0	0	0	0
5	n. d.**	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
15	0,020	0,037	n. d.	0,010	n. d.	n. d.
30	0,069	0,110	0,007	0,225	n. d.	0,002
45	0,128	0,193	0,031	0,652	n. d.	0,004
60	0,226	0,284	0,116	1,082	0,003	0,019
90	0,371	0,492	0,307	2,290	n. d.	0,143

** - nicht detektiert

Abb. 30 Bildung von Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltulose/OPD (1 mmol: 1 mmol; cara.) und aus Maltulose/Glycin/OPD (jeweils 1 mmol; MR)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]					
	Glyoxal cara.	Glyoxal MR	Methylglyoxal cara.	Methylglyoxal MR	Diacetyl cara.	Diacetyl MR
0	0	0	0	0	0	0
5	n. d.**	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
10	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
15	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
30	n. d.	0,201	n. d.	0,205	n. d.	0,009
45	0,117	0,330	0,061	0,524	n. d.	0,082
60	0,146	0,411	0,104	0,833	n. d.	0,150
90	n. n.	0,636	n. d.	1,615	n. d.	0,373

** - nicht detektiert

Abb. 32 Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/OPD (1 mmol: 1 mmol)

	α -Dicarbynyle [mol%]				
Zeit [min]	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0
30	0,061	0,004	0,049	0,072	0,039
60	0,127	0,020	0,148	0,142	0,104
120	0,079	0,197	0,535	0,310	0,333
180	0,148	0,261	1,057	0,424	0,557
240	0,170	0,425	1,445	0,564	0,799

Abb. 33 Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/OPD (1 mmol: 1 mmol)

	α -Dicarbynyle [mol%]				
Zeit [min]	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0
30	0,036	1,096	0,057	0,066	0,155
60	0,073	1,984	0,190	0,173	0,468
120	0,065	2,385	0,649	0,470	0,957
180	0,095	2,353	1,156	0,620	1,691
240	0,142	2,106	1,570	0,912	2,346
360	0,227	1,887	2,805	1,469	2,925
480	0,275	1,889	3,911	1,674	2,898

Abb. 34 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad bei der Caramelisierung unter quasi wasserfreien Bedingungen

Zeit [min]	D-Glucose [mol%]	Maltose [mol%]
0	0,839	0,160
30	1,288	0,465
60	1,174	0,618
120	1,046	0,743
180	1,103	0,795
240	1,033	0,688
360	-*	1,085
480	-	1,711

*- keine Messung

Abb. 35 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus D-Glucose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]					
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl
0	0	0	0	0	0	0
15	0,424	0,486	0,795	0,122	0,751	0,000
30	0,820	2,112	3,762	0,280	2,033	0,347
60	1,016	4,093	4,898	0,289	3,603	0,578
120	1,205	3,429	6,031	0,600	4,379	0,533
180	1,309	4,111	5,852	0,606	5,499	0,914

Abb. 36 Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Zeit [min]	α -Dicarbynyle [mol%]				
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0
30	0,137	0,167	0,959	0,067	0,539
60	0,300	n. n.	4,623	0,261	1,289
120	1,426	0,962	12,344	0,720	2,067
180	1,847	1,441	17,705	0,804	2,701
240	1,888	1,358	18,091	0,965	2,942

Abb. 37 Bildung von α -Dicarbynylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Maltotriose/Glycin/OPD (1 mmol: 1 mmol: 1 mmol)

Zeit [min]	α -Dicarbynyle [mol%]					
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl
0	0	0	0	0	0	0
30	0,045	0,030	0,181	0,130	0,786	0
60	0,108	0,054	0,478	0,489	2,292	0
120	0,307	0,145	1,996	1,469	5,612	0
180	0,466	0,138	3,153	1,940	5,585	0,012
240	0,558	0,208	4,028	1,789	5,890	0,038
360	1,572	0,360	10,011	n. n.***	3,872	n. n.
480	2,282	0,621	16,039	n. n.	3,248	n. n.

***- nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 38 Bildung von Fructosglycin aus D-Glucose/Glycin/OPD und von Maltulosglycin aus Maltose/Glycin/OPD in Maillard-Reaktionsmodellen im quasi wasserfreien Milieu

Zeit [min]	Maltulosglycin [mol%]	Fructosglycin [mol%]
0	0	0
30	3,27	8,89
60	6,80	7,342
120	10,63	2,61
180	10,78	1,87
240	8,26	n. d.**

** - nicht detektiert

Abb. 39 Bildung von Kohlenhydraten mit niedrigem Polymerisierungsgrad bei der Maillard-Reaktion von Maltose und Maltotriose unter quasi wasserfreien Bedingungen

Zeit [min]	Maltose [mol%]	D-Glucose [mol%]
0	0,150	0,840
30	n. n.***	2,701
60	0,380	3,778
120	1,836	3,405
180	2,097	2,065
240	2,862	1,124
360	5,191	n. d.**
480	3,565	n. d.

** - nicht detektiert

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 44 Bildung von α -Dicarboonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) im quasi wasserfreien Reaktionsmilieu aus Fructosglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)

Zeit [min]	α -Dicarboonyle [mol%]					
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl
0	0	0	0	0	0	0
30	0,221	0,380	0,024	0,074	0,035	0,064
60	0,494	0,775	0,077	0,191	0,097	0,096
120	1,128	1,808	0,646	0,535	0,993	0,180
180	1,726	2,651	0,932	0,865	1,276	0,304
240	1,792	2,937	1,403	0,768	2,020	0,383

Abb. 45 Abbau von Fructosglycin im quasi wasserfreien Milieu aus Fructosglycin/OPD (0,1 mmol: 0,1 mmol)

Zeit [min]	Fructosglycin [mol%]
0	100
30	5,87
60	3,02
120	3,22
180	2,35
240	1,00

Abb. 46 Bildung von α -Dicarboonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/OPD

Zeit [min]	α -Dicarboonyle [mol%]		
	3-DP	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0
30	0,018	0,034	0,012
60	0,065	0,071	0,015
120	0,230	0,201	0,029
180	0,445	0,287	0,017
240	0,632	0,314	0,024

Abb. 47 Bildung von D-Fructose aus D-Glucose (Glc/OPD) und Maltulose aus Maltose (Mal/OPD) bei der Caramelisierung in wässriger Lösung

Zeit [min]	D-Fructose [mol%]	Maltulose [mol%]
0	0	0
30	0	1,60
60	6,64	4,00
120	6,71	5,31
180	10,49	7,63
240	10,17	10,09

Abb. 48 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus D-Glucose/Glycin/OPD

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]				
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0
30	0,080	0,047	n. d.**	0,224	0,260
60	0,212	0,144	n. d.	0,547	0,575
120	0,436	0,366	0,103	1,016	0,915
180	0,823	0,613	0,151	1,309	1,000
240	1,155	0,858	0,187	1,586	1,213

** - nicht detektiert

Abb. 49 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in 0,25 M Lösung aus Maltose/Glycin/OPD

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]					
	1-DH	3-DH	3-DP	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0	0
30	0,089	0,016	0,053	0,015	0,099	0,069
60	0,180	0,035	0,233	0,038	0,200	0,118
120	0,261	0,112	0,688	0,063	0,396	0,190
180	0,313	0,153	1,266	0,076	0,474	n. n.***
240	0,240	0,239	1,863	0,084	0,550	0,290

*** - nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 50 Abnahme der Kohlenhydratkomponente in den Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD), Maltose (Mal/Gly/OPD) und Maltotriose (M3ose/Gly/OPD) in wässriger Lösung

Zeit [min]	D-Glucose [mol%]	Maltose [mol%]	Maltotriose [mol%]
0	100	100	100
30	46	52	41
60	54	53	38
120	45	51	36
180	n. n.***	43	29
240	34	33	28

***- nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 51 Bildung von Fructosglycin und Maltulosglycin in Maillard-Reaktionsmodellen von D-Glucose (Glc/Gly/OPD) bzw. Maltose (Mal/Gly/OPD) in wässriger Lösung

Zeit [min]	Fructosglycin [mol%]	Maltulosglycin [mol%]
0	0	0
30	1,06	2,33
60	2,14	2,98
120	2,85	3,37
180	n. n.***	3,06
240	3,08	2,21

***- nicht nachgewiesen, nicht auswertbarer Peak

Abb. 57 Bildung von α -Dicarbonylen (nachgewiesen als Chinoxaline) in wässriger Lösung aus Fructosglycin/OPD (jeweils 0,25 M)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]				
	1-DH	3-DH	1,4-DDH	Glyoxal	Methylglyoxal
0	0	0	0	0	0
30	2,02	1,22	0,03	0,07	0,17
60	4,46	2,66	0,06	0,22	0,45
120	9,06	5,62	0,18	0,66	1,02
180	12,03	7,55	0,23	0,92	1,43
240	14,00	8,82	0,28	1,05	1,64

Abb. 58 Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,270 g in 10 ml)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]	
	3-DP	Glyoxal
0	0	0
30	0,002	0,005
60	0,012	0,009
120	0,041	0,023
180	0,077	0,027
240	0,094	0,022

Abb. 59 Bildung von α -Dicarbonylen aus Dextrin 10 /Gly/OPD in wässriger Lösung (1,875 g/0,1875 g/0,270 g in 10 ml)

Zeit [min]	α -Dicarbonyle [mol%]	
	3-DP	Glyoxal
0	0	0
30	0,013	0,006
60	0,040	0,013
120	0,116	0,025
180	0,195	0,026
240	0,280	0,031

LEBENS LAUF

Name: Anke Hollnagel

Geboren am: 25. August 1973 in Schwerin

AUSBILDUNG:

1979-1989 Polytechnische Oberschule Schwerin/Wickendorf
1989-1991 Erweiterte Oberschule „Johann Wolfgang von Goethe“,
Schwerin
Abschluss: Abitur
9/1991-1993 Humboldt-Universität zu Berlin
Grundstudium Chemie,
1993-1995 Technische Universität Berlin
Hauptstudium Lebensmittelchemie
1/1996-8/1996 Diplomarbeit an der University of Leeds (Groß
Britannien) Thema: „ Glycerinaldehyde, a study on it's
role in the Maillard browning“
9/1996 Diplom (Prädikat „sehr gut“)
11/1996- Dissertation unter Betreuung von Prof. Kroh im Institut
für Lebensmittelchemie der Technischen Universität

FORSCHUNGS AUFENTHALTE:

4/98-7/98 Institut für Organische Synthese
an der Universität Rostock
4/99 Department of Integrated Food Science
Wageningen Agricultural University (Niederlande)