

Lebensmittelchemie

**Einfluss der Reaktionswege der Maillard-Reaktion  
von Pentosen auf die Bildung heterocyclischer  
aromatischer Amine**

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

vorgelegt von  
Oliver Frandrup-Kuhr  
aus Münster

- 2004 -

Dekan:

Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. K. Eichner

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. H.-P. Thier

Tag der mündlichen Prüfungen:

05., 13. und 15. Juli 2004

Tag der Promotion:

15. Juli 2004





## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K. Eichner danken. Durch die Bereitstellung des Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft hat er diese Arbeit maßgeblich beeinflusst. Sein freundliches, offenes Wesen sorgte stets für eine angenehme Atmosphäre. Gleichzeitig möchte ich Frau R. Eichner danken, dass ich ihren Mann über viele Sonntagnachmittage hinweg in Anspruch nehmen durfte.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Dr. Ch. Goldbeck für das gute Klima und viele unterhaltsame Momente in unserem Labor danken, in welchem sich Rheinländer und Westfale stets gut ergänzt haben.

Herrn Prof. Dr. T. Hofmann danke ich für die vielen fachlichen Diskussionen und die stetige Unterstützung meiner Vorhaben. Für die hilfreiche und kollegiale Unterstützung möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken. Dieser Dank gilt insbesondere Herrn Dipl.-Ing. K.-H. Scheele für zahlreiche Umbau-, Reparatur- und Wartungsarbeiten an den von mir genutzten Geräten.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. T. Bernsmann, der mir den Einstieg in die LC-MS/MS-Analytik sowohl durch fachliche Anleitung als auch durch Messzeit am CVUA Münster ermöglichte.

Mein Dank gilt auch Herr H.-U. Lammers, Frau B. Schlutt, Frau C. Schneider und Frau A. Timm, die durch ihre wissenschaftlichen Abschlussarbeiten zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich noch Herrn H. Dransmann für die abschließende Rechtschreibkorrektur danken.



Meiner Mutter Hedwig Fögeling,  
meinem Vater Ludger Fögeling  
und meiner Schwester Silke





## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bisheriger Kenntnisstand über die Grundlagen der Maillard-Reaktion und die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine	1
1.1.1	Erwünschte und unerwünschte Folgeprodukte der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln	1
1.1.1.1	Reaktionsschritte der Maillard-Reaktion von Hexosen	6
1.1.1.2	Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen	16
1.1.2	Bildung und Vorkommen von heterocyclischen aromatischen Aminen in der Umwelt und in Lebensmitteln	22
1.1.2.1	Chemische Strukturen der heterocyclischen aromatischen Amine	22
1.1.2.2	Vorkommen von HAAs in Lebensmitteln	26
1.1.2.3	Vorkommen von HAAs in Umweltproben	27
1.1.3	Vorgeschlagene Bildungswege von HAAs (Chinoline und Chinoxaline)	30
1.1.4	Einflussgrößen der Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen	36
1.1.4.1	Zubereitungstemperatur und Zubereitungszeit	36
1.1.4.2	Grundzusammensetzung der Lebensmittel	38
1.1.4.3	Weitere die Bildung von HAAs beeinflussende Faktoren	40
1.1.5	Einfluss von Abbauprodukten der frühen Phase der Maillard-Reaktion auf die Bildungsrate von HAAs	41
1.2	Problemstellung und Zielsetzung	43
2	Untersuchungen zur Analytik von heterocyclischen aromatischen Aminen	46
2.1	Überblick über verschiedene gängige Aufarbeitungsschritte	46
2.1.1	Notwendigkeit einer Isolierung und Aufreinigung	46
2.1.2	Mögliche Extraktionsverfahren	46
2.1.3	Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Verteilschritte	47
2.1.3.1	Flüssig-Flüssig-Verteilung mit verschiedenen Lösungsmitteln	47
2.1.3.2	Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Verteilung an Festphasen	48
2.1.4	Reinigung gewonnener Isolate durch Säulenchromatographie und semipräparative HPLC	49

---

2.1.5	Reinigung gewonnener Isolate durch Festphasenextraktion (SPE)	50
2.2	Eigene Arbeitsschritte zur quantitativen Extraktion, Isolierung und Aufreinigung	51
2.2.1	Extraktion im Säuren mit nachgeschalteter Flüssig-Flüssig-Verteilung	51
2.2.2	Aufreinigung an SCX-SPE	52
2.3	Nachweis- und Bestimmungsmethoden	53
2.3.1	Überblick über publizierte Methoden	53
2.3.2	Mutagenitätstest	53
2.3.3	Immunoassay	54
2.3.4	Kapillarelektrophorese	54
2.3.5	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	55
2.3.5.1	Trennprinzip	55
2.3.5.2	Aufbau der in den eigenen Arbeiten verwendeten Trennsysteme	56
2.3.5.3	Säulen- und Fließmittelwahl	60
2.3.5.4	Geeignete Detektoreinheiten für die Bestimmung der HAAs mittels HPLC	65
2.3.5.5	Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung mittels HPLC	76
2.3.5.6	Nutzung des charakteristischen Fragmentierungsverhaltens nach Stoßionisation für die Bestimmung von HAAs mittels HPLC- MS/MS	77
2.3.6	Gaschromatographie	83
2.3.6.1	Trennprinzip	84
2.3.6.2	Aufbau der in den eigenen Arbeiten verwendeten Trenn- und Detektorsysteme	84
2.3.6.3	Geeignete Detektoreinheiten für die Bestimmung der HAAs mittels GC	86
2.3.6.4	Versuch der Trennung von underivatisierten HAAs – Notwendigkeit der Derivatisierung	90
2.3.6.5	Derivatisierungstechniken	91
2.3.6.6	Quantitative Bestimmung der HAAs als tert.-Butyldimethylsilyl- derivate mit GC-MS	110

---

3	Bildung von Maillard-Produkten und von heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) in wasserarmen Avicel-Modellsystemen	125
3.1	Einsatz von Modellsystemen	125
3.1.1	Bisher untersuchte Modellsysteme zur Klärung der Bildung von HAAs	127
3.1.1.1	Grundsätzlicher Aufbau der Modellsysteme	127
3.1.1.2	Mögliche Grundkomponenten eines wasserarmen Modellsystems	131
3.1.2	Vorteile von Modellsystemen auf Avicel-Basis	133
3.1.3	Lagerung von Modellsystemen auf Avicel-Basis	135
3.2	Auswahl der Komponenten der in den eigenen Arbeiten verwendeten Modellsysteme	138
3.2.1	Pentosen und ihre Folgeprodukte als Reaktionspartner bei der Bildung von HAAs	138
3.2.2	Weitere Komponenten der Modellsysteme	140
3.2.3	Erhitzung von Avicel Modellsystemen	143
3.3	Bildung und präparative Darstellung von Carbonylkomponenten der Modellsysteme	145
3.3.1	Herstellung von Amadori-Produkten	145
3.3.1.1	Vorversuche	146
3.3.1.2	Bestimmung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Xylose-Alanin-Modellansätzen als OPD-Addukte	147
3.3.1.3	Präparative Herstellung von Amadori-Verbindungen der Xylose	153
3.3.1.4	Untersuchungen vor der Reinigung und Isolierung des Rohpräparates	154
3.3.1.5	Reinigung des Rohextraktes und Isolierung von Xylulose-Amadori-Verbindungen	155
3.3.1.6	Strukturaufklärung der gewonnenen gereinigten Xylose-Amadori-Präparate mit GC-MS nach Oximierung (Hydroxylammoniumchlorid) und Silylierung	160
3.3.2	Versuch einer Synthese von 3-Desoxypentosulosen und 1-Desoxypentodiulosen	164
3.4	Analysenverfahren zur Erfassung der bei Erhitzung und Lagerung von Modellsystemen gebildeten Reaktionsprodukte	166
3.4.1	Erfassung des Bräunungsverhaltens zur Beschreibung der fortschreitenden Maillard-Reaktion	166

---

3.4.2	Abfangreaktionen von Zwischenstufen der Maillard-Reaktion	167
3.4.2.1	Abfangreaktionen mit OPD in zuckerreichen Modellsystemen	171
3.4.2.2	Analytik von Chinoxalinen und weiteren OPD-Addukten aus wasserarmen Modellsystemen	173
3.4.3	Reinigung, Isolierung und Analytik der in den Modellsystemen gebildeten HAAs	175
3.5	Charakterisierung der Reaktionswege bei der Erhitzung einfacher, Kreatinin, Aminosäuren und Pentose enthaltender Modellansätze	177
3.5.1	Bräunungsverhalten	179
3.5.2	Erkenntnisse aus dem Einsatz von ortho-Phenylendiamin als Trapping-Reagenz („Eintopfreaktion“)	185
3.5.2.1	Vorversuche	185
3.5.2.2	Qualitative Auswertung der Trapping-Versuche mit OPD	186
3.5.2.3	Vorbemerkung zur quantitativen Auswertung von Modellsystemen mit OPD als Abfangreagenz	192
3.5.2.4	Vergleich der in verschiedenen Avicel-Modellsystemen gebildeten Reaktionsprodukte	195
3.5.2.5	Trennung und Nachweis von OPD-Reaktionsprodukten aus wasserarmen Modellsystemen mit HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD	198
3.6	Bildung von HAAs in Einkomponentensystemen mit Glycin als Aminosäure	202
3.6.1	Einfluss von Xylose und Xyloseabbauprodukten als Carbonylkomponenten auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen	203
3.6.2	Einfluss von Norfuraneol als Kohlenhydratkomponente auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen	210
3.6.3	Einfluss von Methylglyoxal als Carbonylkomponente auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen	211
3.6.4	Einfluss der Temperatur auf die Bildungsrate von HAAs bei Xylose und Xyloseabbauprodukte enthaltenden Modellsystemen	213
3.7	Bildung von HAAs in Einkomponentensystemen mit Alanin als Aminosäurekomponente	216
3.8	Bildung von HAAs in Zweikomponentensystemen	218
3.8.1	Untersuchungen an Modellsystemen mit zwei Zuckerkomponenten	219
3.8.2	Festsetzung von variablen Parametern für weitere Versuchsreihen	220

---

3.8.3	Einfluss verschiedener Carbonylkomponenten auf die HAA-Bildung	221
3.8.4	Einfluss unterschiedlicher Anteile von Xylose in Glucose/ Glycin/Kreatinin-Modellsystemen	222
3.8.5	Einfluss unterschiedlicher Anteile an Norfuraneol in Glucose/ Glycin/Kreatinin-Modellsystemen	225
3.8.6	Einfluss unterschiedlicher Anteile an Methylglyoxal in Glucose/ Glycin/Kreatinin-Modellsystemen	227
3.8.7	Einfluss weiterer Zusätze zu Glucose/Glycin/Kreatinin-Modellsystemen	230
3.9	Bildung von HAAs in Avicel-Modellsystemen auf Fleischextraktbasis	237
3.9.1	Zusammensetzung von käuflichem Fleischextrakt	237
3.9.2	Zusammensetzung von Modellen auf der Basis von Fleischextrakt	240
3.9.3	Zusammenfassung der Erkenntnisse aus Avicel-Modellsystemen auf Fleischextraktbasis	246
4	Markierungsversuche	247
5	Zusammenfassung	255
6	Arbeitsvorschriften	263
6.1	Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien	263
6.2	Grundlegende Arbeitsschritte	264
6.2.1	Destillation und Lagerung von Lösungsmitteln	264
6.2.2	Desaktivierung von Glasgeräten	264
6.2.3	Entfernung geringer Mengen an Lösungsmitteln aus Probelösungen	265
6.3	Präparative Darstellung von Amadori-Verbindungen der Xylose	266
6.3.1	Reaktionsführung bei präparativen Modellansätzen	266
6.3.2	Aufarbeitung der Reaktionsmischung zu Rohpräparaten	266
6.3.3	Weitere Arbeitsschritte zu Isolierung und Reinigung von Amadori- Verbindungen der Xylose	267
6.3.3.1	Durchführung von Tüpfelreaktionen als Screening auf Amadori- Verbindungen	267
6.3.3.2	Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an Merck-Lewatit- Kationenaustauschern	267

---

6.3.3.3	Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an Fractogel-Kationenaustauschern mit nachgeschaltetem RI-Detektor	268
6.3.3.4	Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an chemisch gebundenen Aminophasen mittels HPLC	269
6.4	Präparative Darstellung des 3-Desoxyosons der Xylose nach Kato	270
6.5	Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM)	271
6.5.1	Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) zur Bestimmung des Bräunungsverhaltens	273
6.5.2	Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) mit OPD als Trapping-Reagenz	273
6.5.3	Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) zur Bestimmung von HAA-Bildungsraten	273
6.5.4	Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) unter Einsatz <sup>13</sup> C-markierter Glucose – Markierungsexperimente	274
6.6	Definierte Lagerung von Avicel-Modellsystemen	274
6.6.1	Lagerung von Avicel-Modellsystemen (AM) in Exsikkatoren bestimmter Gleichgewichtsfeuchte	274
6.6.1.1	Einstellung verschiedener Gleichgewichtsfeuchten in AM	274
6.6.1.2	Kontrolle der Gleichgewichtsfeuchte von AM durch Bestimmung des Wassergehaltes nach der Vakuumtrockenschrankmethode	275
6.7	Spezielle Arbeitsschritte zwecks Bestimmung der Bildungsrate von HAAs in erhitzten Avicel-Modellsystemen (AM)	276
6.7.1	Erhitzung (T > 70 °C) von Avicel-Modellsystemen in dickwandigen Glasgefäßen	276
6.7.2	Salzsaure Extraktion von HAAs aus erhitzten AM und Reaktionsaromen	277
6.7.3	Abtrennung von Salzsäure-unlöslichen Modellbestandteilen der AM und Reaktionsaromen	277
6.7.4	Isolierung von HAAs durch Flüssig-Flüssig-Verteilschritte mit Dichlormethan	277
6.7.5	Weitere Reinigung an SCX-Festphasen	278
6.8	Häufig verwendete instrumentell-analytische Analyseverfahren	279
6.8.1	HPLC	279
6.8.1.1	Mess- und Steuerparameter der verwendeten HPLC -Trennsysteme	279

---

6.8.1.2	Analytische HPLC-UV/VIS-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur	281
6.8.1.3	Analytische HPLC-DAD-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur	281
6.8.1.4	Semipräparative HPLC-DAD-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur mit anschließender Fraktionierung	282
6.8.1.5	Analytische HPLC-DAD-Trennung von HAAs (Verwendung eines TEAP-Acetonitril-Eluenten)	283
6.8.1.6	Analytische HPLC-DAD-Trennung von HAAs (Verwendung eines Ammoniumformiat-Acetonitril-Eluenten)	284
6.8.2	HPLC-MS/MS	285
6.8.2.1	Mess- und Steuerparameter des verwendeten HPLC-MS/MS-Trennsystems (Fa. Micromass)	285
6.8.2.2	Analytische HPLC-MS/MS-Trennung von HAAs (Verwendung eines Ammoniumformiat-Acetonitril-Eluenten)	286
6.8.3	GC-FID/GC-ECD	288
6.8.3.1	Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-FID- (und GC-ECD-Trennsystems)	288
6.8.3.2	Analytische GC-FID-Trennung von oximierten und silylierten OPD-haltigen Proben	288
6.8.4	GC-ITD	289
6.8.4.1	Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-ITD-Trennsystems	289
6.8.5	GC-Quadrupol-MS	290
6.8.5.1	Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-MS-Systems	290
6.8.5.2	Analytische GC-MS-Trennung von oximierten und silylierten zuckerhaltigen Proben	291
6.8.5.3	Analytische GC-MS-Trennung von oximierten und silylierten OPD-haltigen Proben	292
6.8.5.4	Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (EI)	293
6.8.5.5	Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (PCI-Methan)	295
6.8.5.6	Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (PCI-Ammoniak)	295

---

6.8.5.7 Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (NCI-Ammoniak)	296
6.9 Derivatisierungstechniken	296
6.9.1 Acetylierung von HAAs durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid	296
6.9.2 Acylierung von HAAs durch Umsetzung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA)	297
6.9.3 Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit 3,5-Bis(trifluoromethyl)benzylbromid (TFBB)	297
6.9.4 Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit $\alpha$ -Pentafluorotoluol	298
6.9.5 Silylierung von HAAs durch Umsetzung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)	299
6.9.6 Silylierung von HAAs durch Umsetzung mit N-tert.-Butyldimethylsilyl-N-methyl-trifluoracetamid (MTBSTFA)	300
6.9.7 Quantitative Bestimmung von HAAs mittels GC-MS über 4,7,8-TriMeIQ <sub>x</sub> als inneren Standard	300
6.10 Sonstige wichtige analytische Mess- und Bestimmungsmethoden	301
6.10.1 Durchführung von Bräunungsmessungen	301
6.10.2 Analyse von Aminosäuren mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA	302
7 Literaturverzeichnis	308
8 Anhang	322
9 Abkürzungsverzeichnis	333



## 1 Einleitung

### 1.1 Bisheriger Kenntnisstand über die Grundlagen der Maillard-Reaktion und die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine

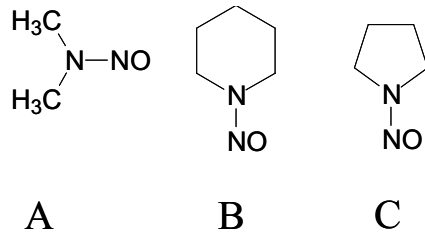
#### 1.1.1 Erwünschte und unerwünschte Folgeprodukte der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln

Intensive Forschung über mehrere Jahrzehnte hindurch hat gezeigt, dass die Entstehung einzelner chronischer Krankheiten eng mit der Art und Weise der Ernährung zusammenhängt. Auf der Basis von epidemiologischen Studien ist heute davon auszugehen, dass durchschnittlich 30 % – die Spanne reicht von 10 % bis 70 % – der neu auftretenden Tumore ernährungsbedingt sind [Lit. 37]. Ein erheblicher Anteil an Krebserkrankungen kann durch gesunde Ernährung und Lebensführung vermieden werden. Der verhütbare Anteil an Dickdarmkarzinomen wird auf 65 % bis 75 % geschätzt. Dickdarmkrebs ist die Krebsform, an der in Deutschland nach Lungenkrebs bei den Männern und Brustkrebs bei den Frauen die meisten Menschen sterben. Neben der einseitigen Ernährung und hyperenergetischer, zu fettreicher Nahrung bei körperlicher Inaktivität [Lit. 34] sind Schadstoffe und Kontaminanten in Lebensmitteln vermeidbare Gesundheitsrisiken. Verstärkter Obst- und Gemüseverzehr sowie eine Umstellung der Ernährung hin zu mehr Vollkornprodukten würde vielen Studien zufolge das Krebsrisiko mindern sowie viele Herz-Kreislauf-Erkrankungen vermeiden helfen [Lit. 315, 156].

Das Vorkommen von Schadstoffen in Lebensmitteln kann jedoch durch eine effektive Lebensmittelüberwachung, gute Herstellungspraxis (GMP) der Lebensmittelproduzenten sowie eine strenge Gesetzgebung auf ein Minimum reduziert werden. Immer häufiger wird auf dem Gebiet der Lebensmittelwissenschaften über die für die Krebsentstehung verantwortlichen Nahrungsbestandteile, die so genannten „food mutagens“, berichtet (vgl. Goldman et al. [Lit. 70]). Sie lassen sich in drei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe sind natürlich vorkommende Inhaltsstoffe. Hierzu zählen toxische Stoffwechselprodukte von Bakterien und Pilzen wie Aflatoxine, Ochratoxine und Fumonisine [Lit. 59]. Zur zweiten Gruppe zählen in Lebensmitteln vorkommende, synthetisch hergestellte Kontaminanten, denen ein mutagenes Potential zugeschrieben wird, wie polychlorierte Biphenyle (PCB, [Lit. 272]) und Nitrososchusverbindungen [Lit. 184]. PCBs sind äußerst persistent und reichern sich aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften im Fettgewebe des Menschen an. Eine weitere Gruppe, hinsichtlich der Menge an unerwünschten Stoffen die größte, bilden krebserregende und mutagene Stoffe, die erst bei



**Nitrosamine**, deren Hauptvertreter in Lebensmitteln Dimethylnitrosamin (vgl. Abb. 1.2, A), Nitrosopiperidin (B) und Nitrosopyrrolidin (C) sind, entstehen beim Erhitzen von gepökelten Lebensmitteln.



**Abbildung 1.2**  
Beispiele für Nitrosamine

Tareke et al. [Lit. 283] konnten **Acrylamid** (Abb. 1.3, D), das besonders beim starken Erhitzen oder Fritieren von fetthaltigen Produkten wie Chips oder Pommes Frites entsteht, erstmals im Jahre 2002 in Lebensmitteln nachweisen. Um die Bildung erklären zu können, wurden zunächst zwei Bildungshypothesen formuliert. Zum einen geht man davon aus, dass Acrylamid durch Oxidation von Acrolein (Abb. 1.3, A) zu Acrylsäure (B), gefolgt von einer Amidbildung mit Ammoniak entstehen könnte. Die Bildung von Acrolein durch thermischen Abbau von Triglyceriden ist bereits bekannt [Lit. 301]. Ammoniak kann bei der Pyrolyse von Stickstoff enthaltenden Bestandteilen während der Lebensmittelverarbeitung entstehen. Eine endgültige Bestätigung der Hypothese steht jedoch noch aus. Als gesichert gilt die Hypothese, die erstmalig von Yaylayan et al. [Lit. 327] diskutiert wurde, wonach Acrylamid in reduzierende Zucker und Asparagin enthaltenden Lebensmitteln im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehen kann. Dabei bildet die  $\alpha$ -Aminogruppe des Asparagins in einer nukleophilen Reaktion mit der Aldehyd-Gruppe der Glucose eine SCHIFF'sche Base. Im weiteren Verlauf bildet sich das N-Glykosid aus Glucose und Asparagin (Abb. 1.3, C), das im Rahmen der Maillard-Reaktion nach Amadori-Umlagerung (vgl. Kapitel 1.1.1.1) zu Bräunungsprodukten oder aber in einer komplexen Reaktionsfolge über Desaminierung und Decarboxylierung zu Acrylamid reagieren kann (vgl. Abb. 1.3).

**Heterocyclische aromatische Amine (HAAs)** entstehen beim scharfen Anbraten von Fisch und Fleisch. Im Jahre 1977 gelang es Sugimura et al. [Lit. 277] und Nagao et al. [Lit. 202] erstmals, die HAAs Try-P-1 (3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol; vgl. Kapitel 1.1.2, Abb. 1.21) und Try-P-2 (3-Amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol) im Rauchkonzentrat von gebratenem Fleisch und Fisch zu identifizieren. Seitdem konnten weitere 20 HAAs

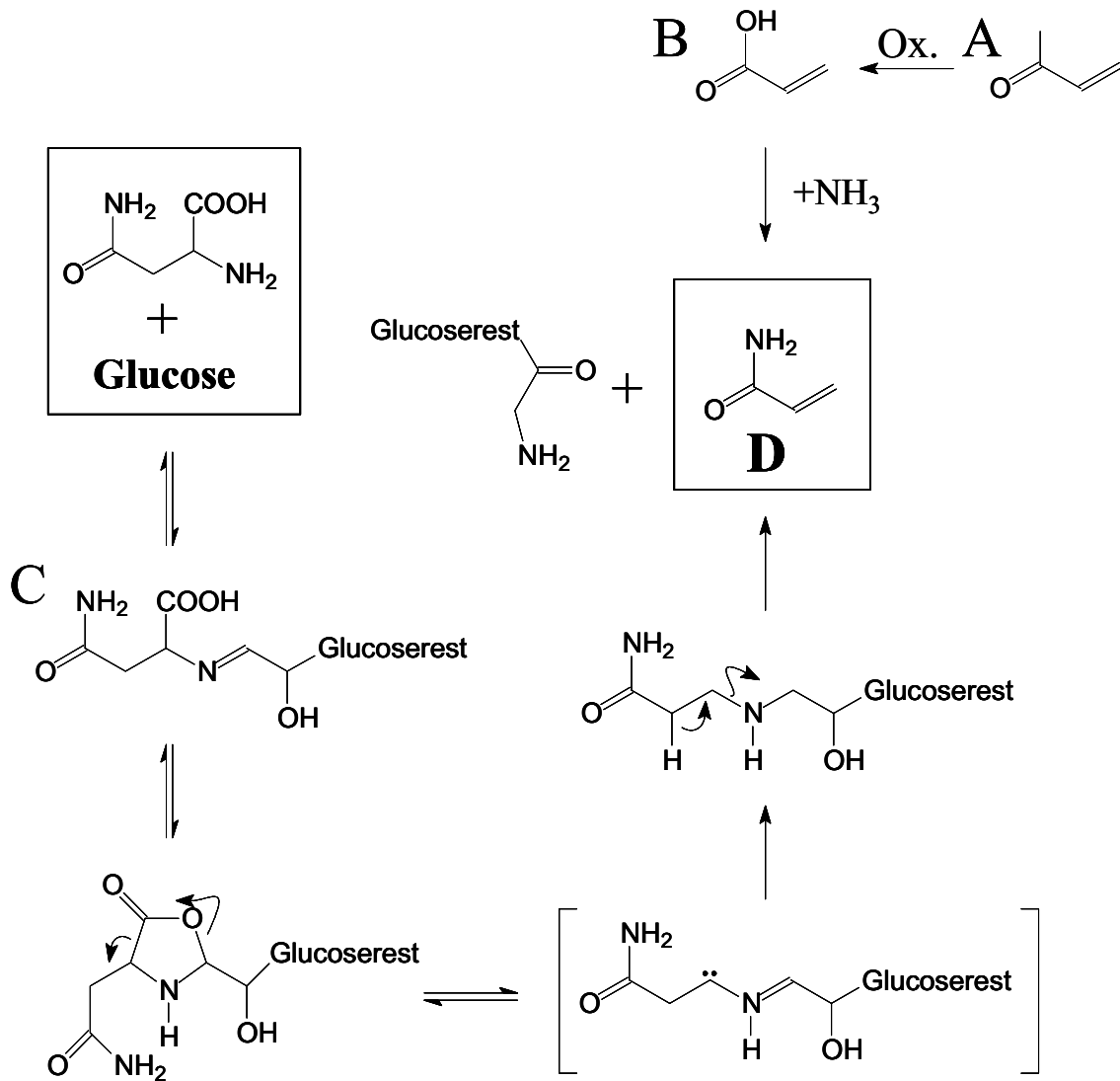


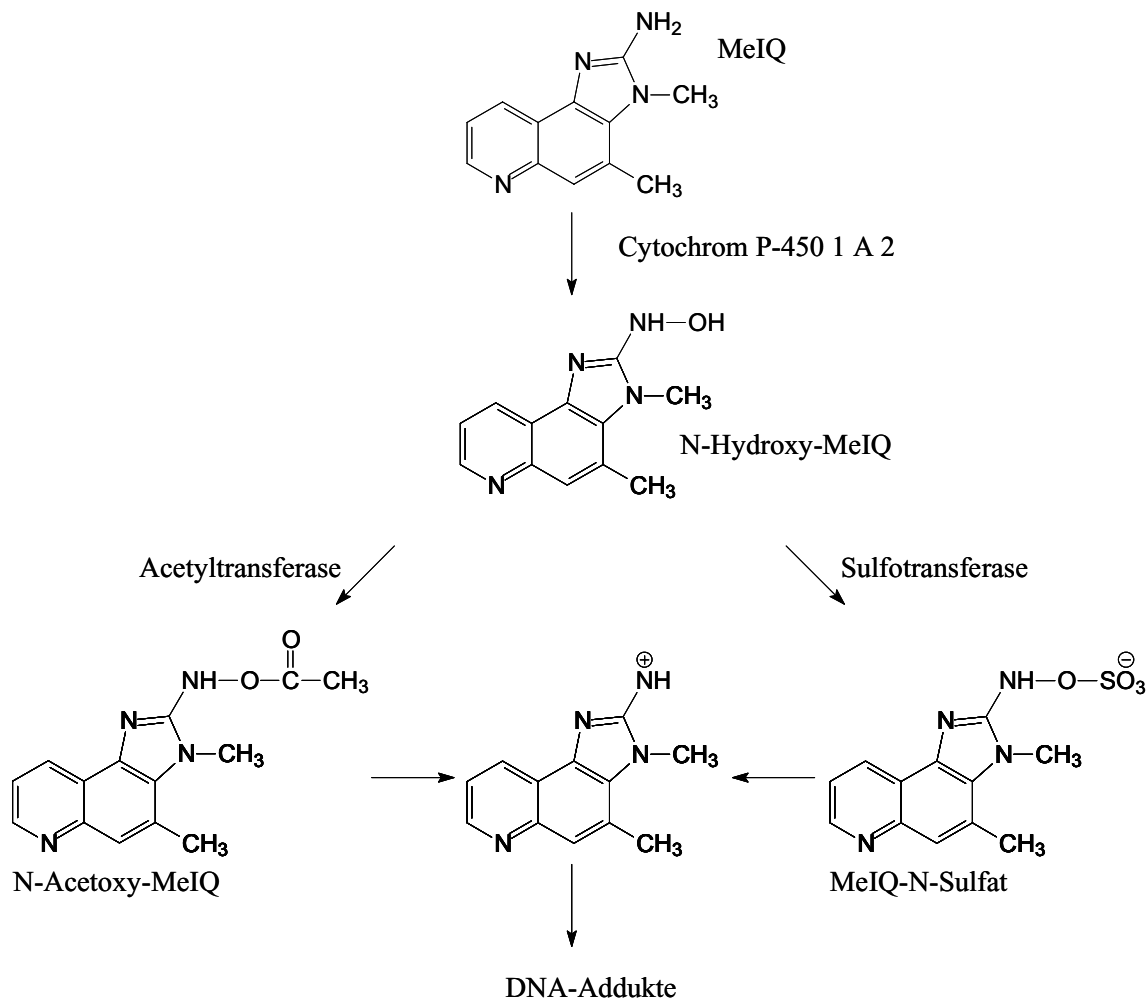
Abbildung 1.3

Schematische Darstellung möglicher Bildungswege von Acrylamid aus Lebensmittelbestandteilen

isoliert und charakterisiert werden. HAAs sind selbst nicht mutagen und genotoxisch, sondern prokarzinogen [Lit. 298]. Eisenbrand und Tang [Lit. 45] beschreiben in ihren Arbeiten, dass erst eine zuvor stattfindende metabolische Aktivierung zu mutagenen Metaboliten führt. Die zweistufige Aktivierung beschreibt Richling [Lit. 235] eingehend im Rahmen ihrer Arbeiten. In Phase 1 werden die aufgenommenen HAAs durch das Leberenzym Cytochrom P 450 1A2 zu Hydroxylaminen oxidiert. In der sich anschließenden Phase 2 erfolgt eine Veresterung dieser Hydroxylamine zu Acetat- oder Sulfateestern, die dann zu Nitreniumionen zerfallen. Diese können anschließend mit DNA-Basen Addukte bilden. Einen Überblick über die metabolische Aktivierung nach Eisenbrand und Tang gibt Abbildung 1.4.

Für die HAAs werden mehrere Bildungshypothesen diskutiert. Die Arbeitsgruppe um Jägerstad [Lit. 112] postulierte im Jahr 1983 mit der „Las Vegas Hypothese“ einen bis heute als

allgemein gültig anerkannten Bildungsweg, der von einer komplexen Reaktion von Kreatinin, Folgeprodukten der Maillard-Reaktion und Aminosäuren ausgeht (vgl. Kapitel 1.1.3).



**Abbildung 1.4**

Mutagenität der HAAs: Metabolische Aktivierung von IQ nach Eisenbrand und Tang [45]

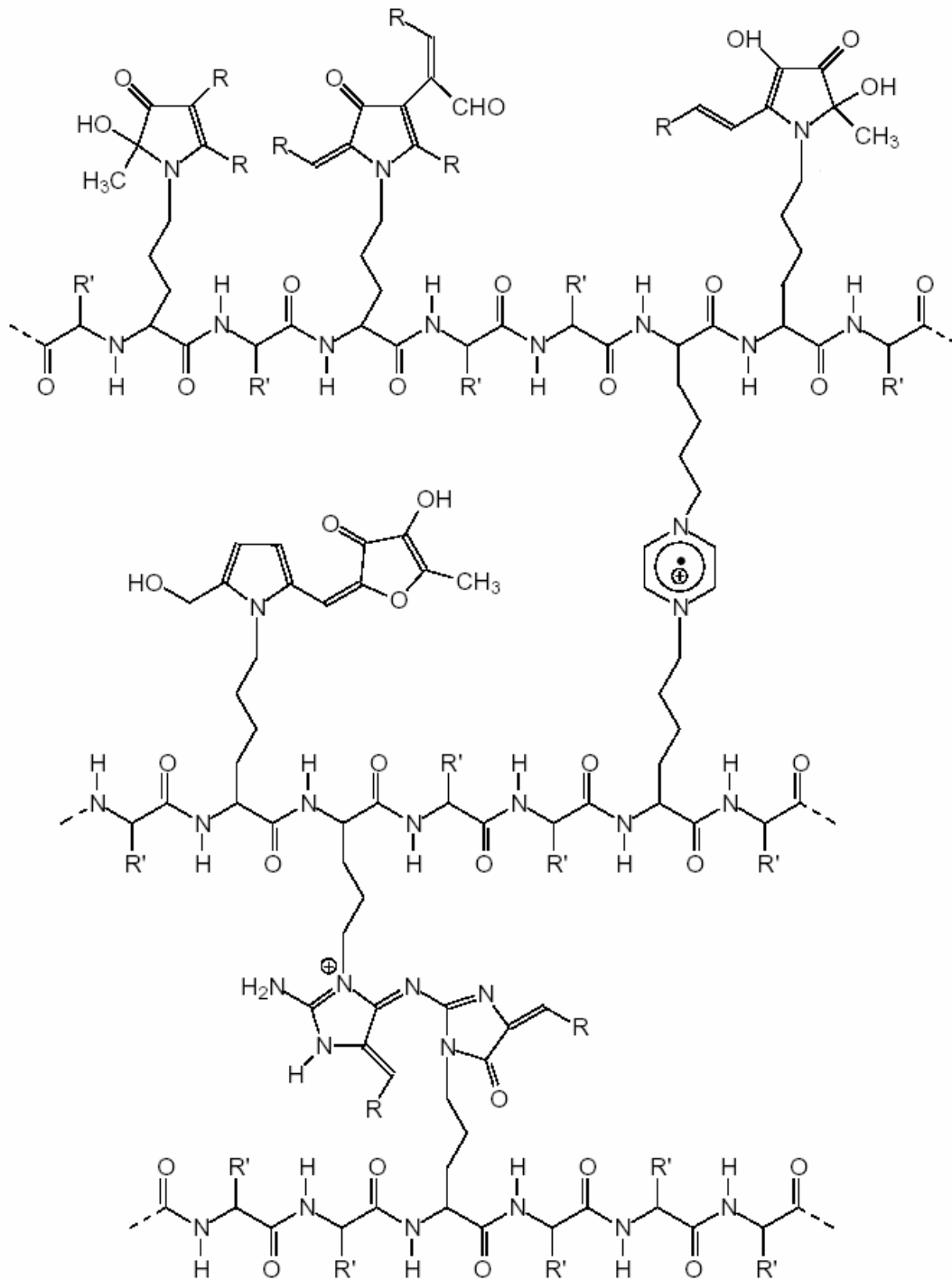
Einerseits zeigt die Bildung von Acrylamid und HAAs – auch wenn diese über unterschiedliche Reaktionswege gebildet werden – dass Maillard-Reaktionsprodukte Vorstufen von unerwünschten Folgeprodukten in Lebensmitteln sein können; andererseits muss an dieser Stelle betont werden, dass im Rahmen der Maillard-Reaktion als einer der wichtigsten Reaktionen in der Lebensmittelchemie auch erwünschte Folgeprodukte wie z. B. aromawirksame Verbindungen sowie Bräunungsprodukte gebildet werden. Sie bestimmen maßgeblich das typische Aroma und Aussehen sowie den charakteristischen Geschmack gekochter, gebratener, gerösteter, getrockneter oder konservierter Lebensmittel (vgl. Lehrbuch der Lebensmittelchemie [Lit. 23]). MRPs, insbesondere Amadori-Verbindungen, waren Schwerpunkte zahlreicher Untersuchungen an erhitzten und gelagerten Lebensmitteln mit dem Ziel, Qualitätsveränderungen während der Lebensmittelverarbeitung messbar machen zu können [Lit. 29, 79, 274,

313, 280]. Wird eine Beeinflussung der Herstellungsprozesse für Lebensmittel dahingehend angestrebt, dass die Bildung von unerwünschten Folgeprodukten, wie z. B. der HAAs, minimiert wird, ist es notwendig, die wichtigsten Reaktionsschritte der Maillard-Reaktion zu kennen.

#### 1.1.1.1 Reaktionsschritte der Maillard-Reaktion von Hexosen

Erhitzt man die wässrige Lösung eines reduzierenden Zuckers, wie Glucose und einer Aminosäure, so kommt es zu einer Vielzahl chemischer Reaktionen, die sich schließlich in einer zunehmenden Bräunung äußern. Erste umfangreiche Untersuchungen dieser Reaktionen wurden bereits im Jahr 1912 von Louis-Camille Maillard [Lit. 166] durchgeführt. Er beobachtete während des Erhitzens von Glucose-Glycin-Modellansätzen die Bildung brauner Pigmente und von Kohlendioxid [Lit. 166]. Diese nach seinem Entdecker benannte Reaktion wird daher auch als nicht-enzymatische Bräunung bezeichnet. Amadori [Lit. 7] berichtete in der Folgezeit von der Bildung zweier aus Glucose und Glycin gebildeter Reaktionsprodukte, die von ihm als stabiles bzw. instabiles Isomer bezeichnet wurden. Kuhn und Weygand [Lit. 147] konnten später zeigen, dass hier zunächst ein instabiles Glucosylamin (N-Glukosid) gebildet wird, das sich später in eine stabilere Aminoketose umlagert. Durch den Nachweis dieser ersten stabilen Zwischenstufe der Maillard-Reaktion konnten sie den ersten Teilschritt des komplexen Verlaufes dieser Reaktion klären. Über die entsprechenden Reaktionen von Ketosen mit Aminosäuren, die zu Aminoaldosen reagieren können, berichteten Heyns et al. [Lit. 94]. Im Jahr 1953 stellte Hodge [Lit. 96] das erste umfassende Reaktionsschema auf, das bis heute allgemein anerkannt ist und deshalb häufig zitiert wird. Hodge erkannte die Komplexität der Maillard-Reaktion und gliederte sie in verschiedene Phasen, die sowohl nacheinander als auch nebeneinander ablaufen können. In einem Übersichtsartikel greift Mauron (vgl. Lit. 181) diese Einteilung auf und formuliert drei Phasen der Maillard-Reaktion: Initial-Stage, Intermediate-Stage und Final-Stage. In der Anfangsphase (Initial-Stage) kommt es nach Bildung des N-Glykosids aus Aminosäure und reduzierendem Zucker durch intramolekulare Umlagerungen zur Bildung von relativ stabilen Zwischenstufen. Sie werden nach ihren Entdeckern Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen genannt. Mit dem weiteren Fortschreiten der Reaktion (Intermediate-Stage) bilden sich auf verschiedenen Wegen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen. Diese Verbindungen sind sehr reaktiv und haben deshalb meist nur intermediären Charakter. Viele dieser Verbindungen haben stark reduzierende Eigenschaften und werden daher als Reduktone bezeichnet. Sie können Lebensmittel gegen den oxidativen Verderb schützen [Lit. 40].

Ferner sind die in der fortschreitenden Phase der Maillard-Reaktion gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen unmittelbare Vorstufen für geruchsaktive Heterocyclen sowie hochmolekulare Melanoidine mit niedrigem Geschmacksschwellenwert, die in der Endphase (Final-Stage) gebildet werden.



**Abbildung 1.5**  
Quervernetzung von Proteinen im Rahmen der Melanoidinbildung

Melanoidine sind braune Pigmente, die oft unter Beteiligung stickstoffhaltiger Zwischenprodukte gebildet werden. Die Melanoidine weisen unterschiedliche Molekulargewichte auf; nach Hofmann [Lit. 97] erfolgt eine Einteilung in niedermolekulare Melanoidine (Struktur aus mehreren Ringsystemen, Molmassen bis 3000 Dalton (D)) und hochmolekulare Melanoidine (Struktur wird durch Quervernetzung gebildet, Molmassen über 100000 D möglich, vgl. Abb. 1.5).

Die folgenden Ausführungen gehen näher auf die verschiedenen Phasen der Maillard-Reaktion ein.

## I. Bildung der Primärstufen der Maillard-Reaktion

### Ia. Bildung von N-Glykosiden

Im ersten Schritt der Maillard-Reaktion kommt es zu einem nucleophilen Angriff der Aminogruppe der Aminosäuren auf die Carbonylfunktion der reduzierenden Zucker (siehe Abb. 1.6). Der Mechanismus läuft dabei wahrscheinlich über die Öffnung der Ringform des Zuckers ab. Nach Addition der Aminoverbindung wird direkt ein Molekül Wasser abgespalten, wodurch sich die entsprechende SCHIFF'sche Base, das Glykosylamin, bildet.

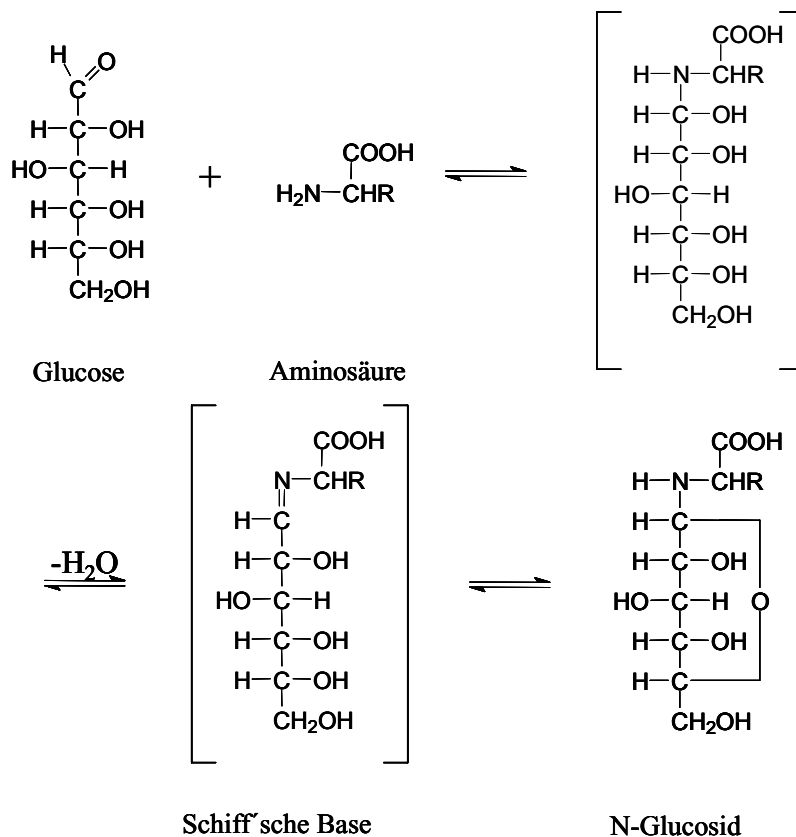


Abbildung 1.6  
Bildungsweise von Glykosiden



Die zunächst gebildeten Glykosylamine sind relativ instabil. Sie können in ihre Ausgangsverbindungen gespalten werden oder sich im Rahmen einer Amadori- bzw. Heyns-Umlagerung stabilisieren. Stabile Glykosylamine erhält man nur aus der Reaktion von reduzierenden Zuckern mit aromatischen und heterocyclischen Aminen. So bildet sich aus der Purinbase Adenin, der Ribose sowie Phosphorsäure das (relativ) stabile ATP.

#### Ib. Amadori-Umlagerung/Heyns-Umlagerung

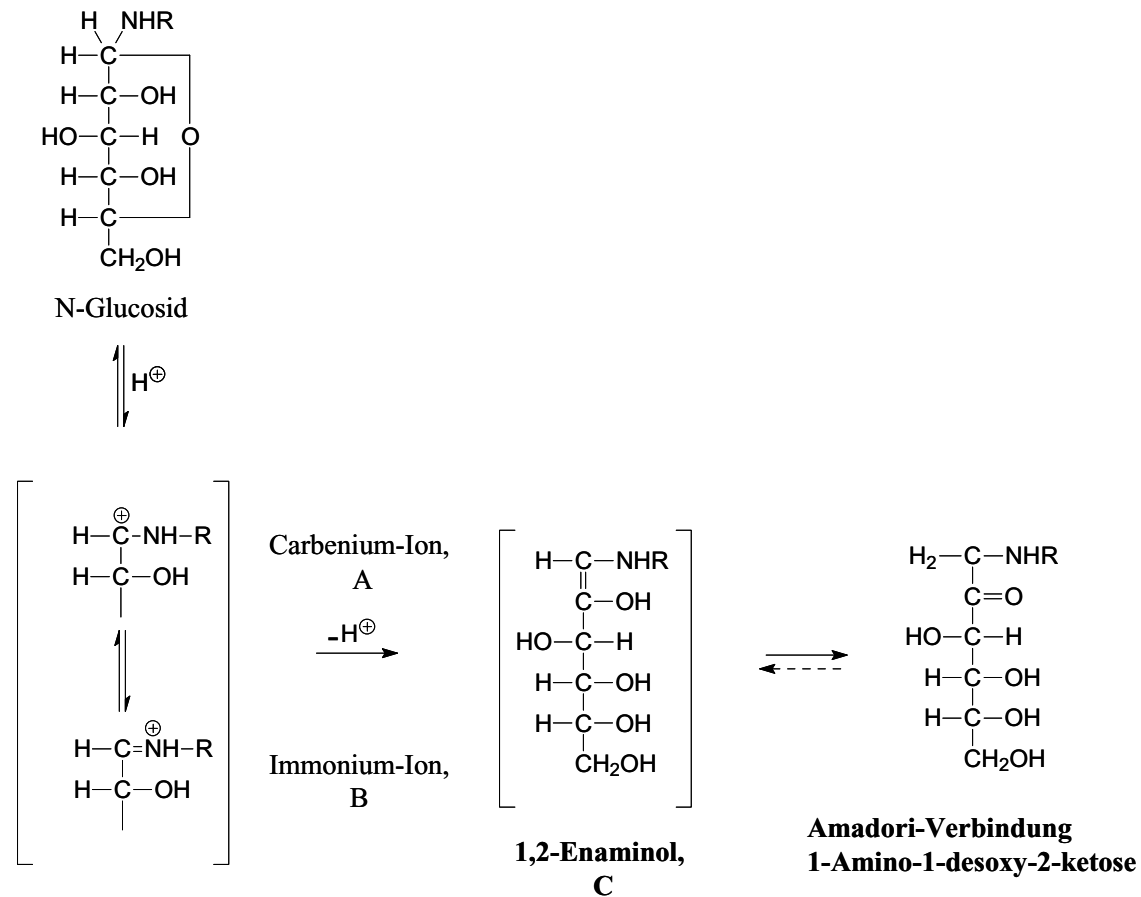
Die instabilen Glykosylamine aus Aldosen und Aminosäuren oder aliphatischen Aminen durchlaufen eine intramolekulare Umwandlung (Amadori-Umlagerung) und werden in die entsprechenden 1-Amino-1-desoxy-ketosen (Ketoseaminosäuren) umgewandelt. Die analoge Umlagerung von Ketosylaminen zu 2-Amino-2-desoxyaldosen wird als Heyns-Umlagerung bezeichnet [Lit. 12].

Die Umlagerung erfolgt unter Katalyse durch geringe Mengen an Protonen, wie in Abbildung 1.7 [Lit. 43] zu sehen, und zwar durch Protonierung des Ringsauerstoffatoms und anschließende Ringöffnung.

Über ein Carbenium-Ion (A) bzw. ein Immonium-Ion (B) kommt es durch 1,2-Enolisierung zur Bildung des sehr instabilen Enaminols (C), welches sich dann zur Amadori- bzw. Heyns-Verbindung umlagert. Die benötigten Protonen müssen im Fall der Reaktion mit Aminosäuren nicht von außen zugeführt werden, da das Carboxylproton des Aminosäurerestes autokatalytisch wirksam ist [Lit. 312].

Die Amadori-Verbindungen werden ohne Induktionsperiode gebildet. Sie sind die ersten analytisch fassbaren Verbindungen der Maillard-Reaktion und konnten in vielen erhitzten und gelagerten Lebensmitteln nachgewiesen werden, und zwar in Obst [Lit. 9], Gemüse [Lit. 232], Sojasauce [Lit. 323], Braumalzen und Bieren [Lit. 313] sowie Kakao [Lit. 87]). Auch im menschlichen Organismus können Amadori-Verbindungen auftreten [Lit. 23]. Sie spielen in Verbindung mit weiteren Produkten der Maillard-Reaktion bei Alterungsprozessen an körpereigenen Proteinen sowie bei Diabetes mellitus eine wichtige Rolle.

Die aus der Heyns-Umlagerung entstehenden Aminoaldosen sind nicht sehr stabil. Sie können wieder in ihre Ausgangsverbindungen gespalten werden oder sich zu Amadori-Verbindungen umlagern [Lit. 92].



**Abbildung 1.7**

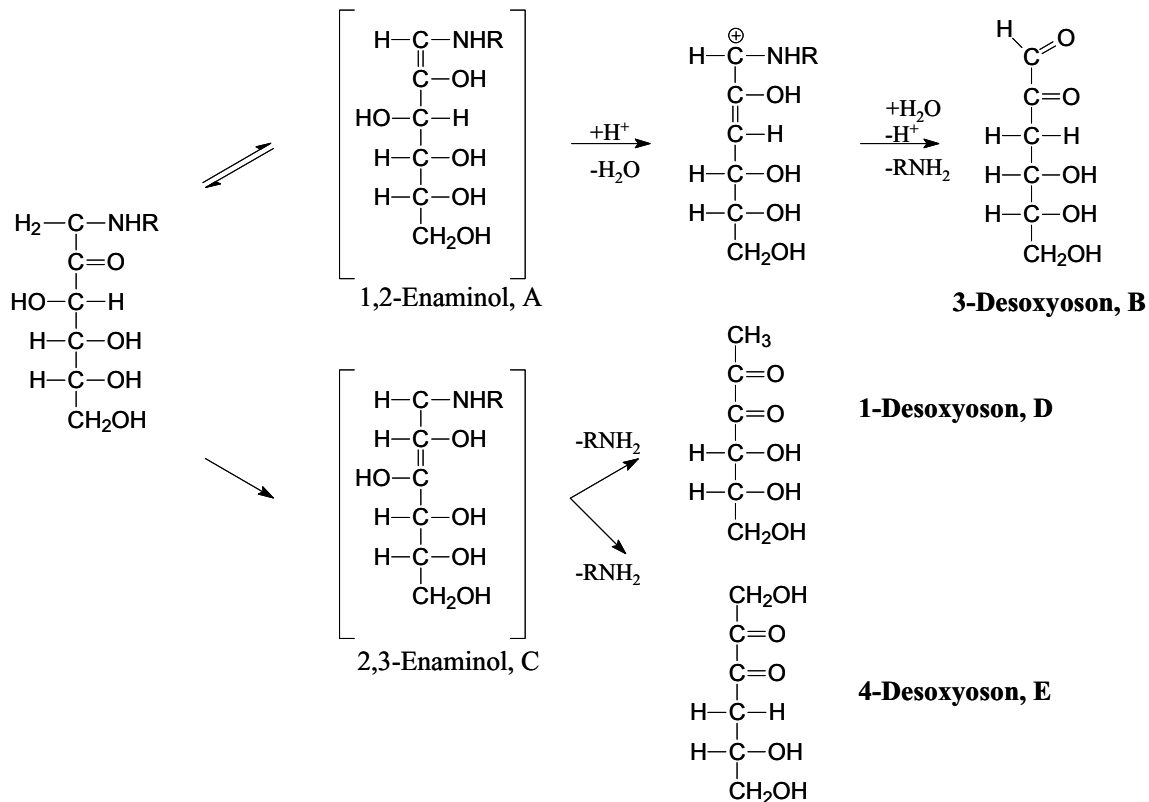
Amadori-Umlagerung, schematisch am Beispiel des N-Glucosids

## II. Über Enolisierungsreaktionen verlaufende Folgereaktionen

Ebenso wie Ketosen und Aldosen neigen auch Amadori-Verbindungen zu Säure-Basen-katalysierten Enolisierungen. Es sind hierbei 1,2- oder 2,3-Enolisierungen möglich, die zu den entsprechenden Enaminolen führen (vgl. Abb. 1.8). Aus dem 1,2-Enaminol (A), das im schwach sauren bis neutralen pH-Bereich entstehen kann, bildet sich nach  $\beta$ -Eliminierung der Hydroxylgruppe am C<sub>3</sub>-Atom und anschließender hydrolytischer Abspaltung der Aminosäure die 3-Desoxy-2-glucosulose (3-Desoxyoson, B), die schon im Jahr 1960 von Anet nachgewiesen wurde [Lit. 10].

Die 2,3-Enolisierung läuft bevorzugt im neutralen bis schwach basischen pH-Bereich ab und führt analog über die Bildung des 2,3-Enaminols (C) zur 1-Desoxy-2,3-glucodiulose, das 1-Desoxyoson (D). Erst im Jahr 1989 konnten Ledl et al. [Lit. 152] diese Verbindung durch Umsetzung der Abbauprodukte von Amadori-Verbindungen mit o-Phenylendiamin und anschließende Isolierung und Identifizierung der entstandenen Chinoxaline (vgl. Kapitel 3.1.5.2) nachweisen [Lit. 152]. Daneben kann durch Abspaltung von Wasser am C<sub>4</sub> des intermediären 2,3-Enaminols die 4-Desoxy-2,3-glucodiulose, das 4-Desoxyoson (E), entstehen [Lit. 244].

Hierbei bleibt der Aminosäurerest am Kohlenhydrat gebunden. Alle Desoxyosone liegen in der cyclischen Halbacetalform vor. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Aminokomponente, die durch ihre Basizität als Protonenakzeptor oder, je nach pH-Wert, auch als Protonendonator Enolisierungsreaktionen und die damit verbundene Wanderung von Carbonylgruppen sowie Wasserabspaltungen katalysiert.



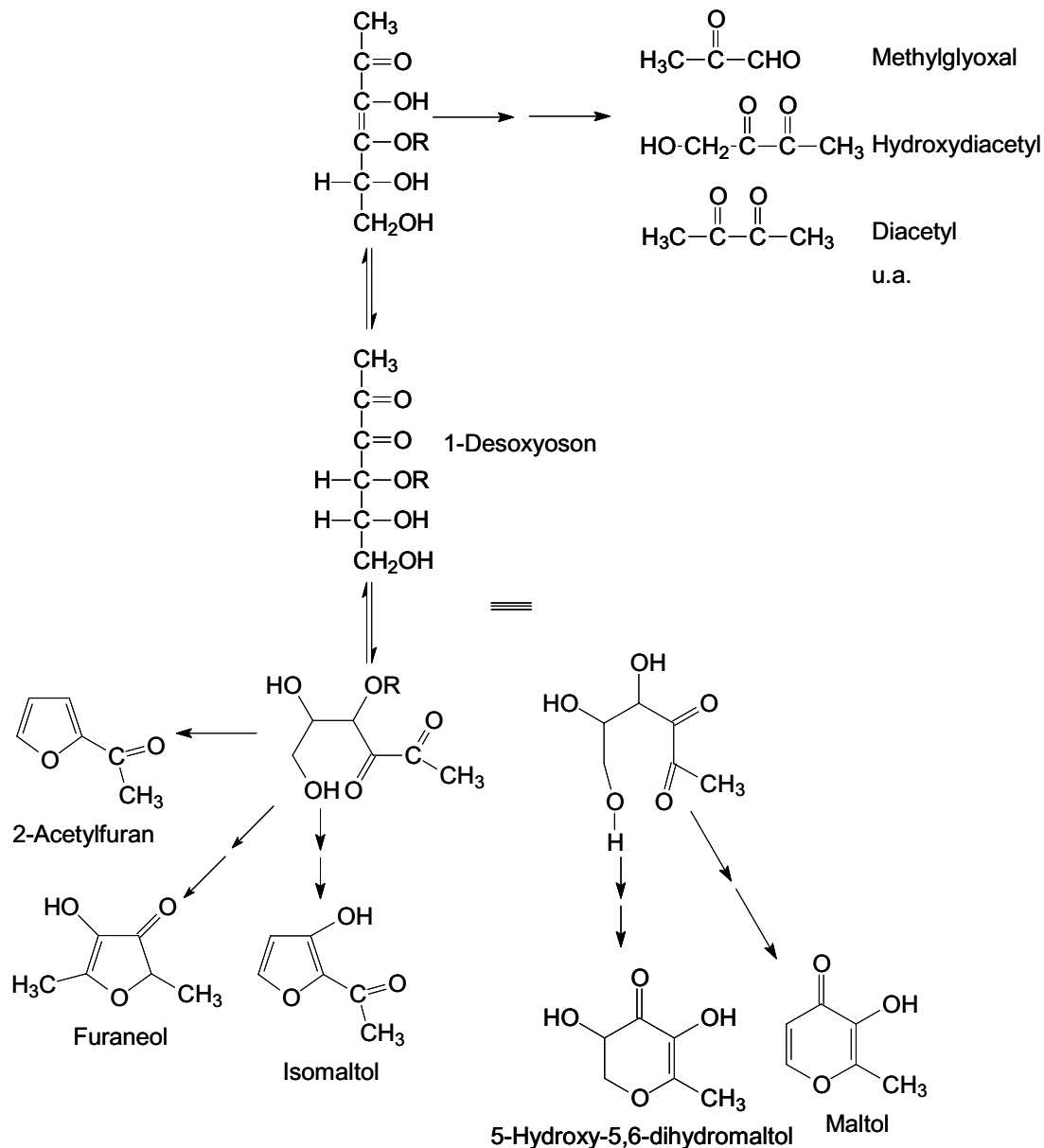
**Abbildung 1.8**  
Enolisierung von AMADORI-Verbindungen

In Abwesenheit von Aminen lässt sich die Bildung der Desoxyosone in durch Wasserabspaltung induzierten Enolisierungsreaktionen nur bei pH-Werten unter 3 und über 8 beobachten. Im alkalischen Milieu ist eine analog zur Lobry-de-Bruyn-van-Eckenstein-Umlagerung, die z. B. eine Isomerisierung von Aldosen zu Ketosen bewirkt, die Umlagerung der Aminoketosene zu Aminoaldosen möglich.

### III. Abbau der intermediär gebildeten Desoxyosone

Der Abbau von Desoxyosonen kann über verschiedene Retroaldol-Spaltungen erfolgen. So können nach erneuter Enolisierung und nachfolgender Spaltung kurzkettige  $\alpha$ -Dicarbonyl- und  $\alpha$ -Hydroxydicarbonyl- entstehen, die sehr reaktiv und/oder geruchsaktiv sind. Ferner können diese mit den Proteinen der Nahrung Quervernetzungen eingehen, was mit einem Verlust der biologischen Wertigkeit in Verbindung gebracht wird.

Beim Abbau von 1-Desoxyosonen (vgl. Abb. 1.9) werden neben den Dicarbonylen Methylglyoxal (Abb. 1.9), Diacetyl, Hydroxydiacetyl auch sauerstoffhaltige Heterocyclen wie, 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol), Isomaltol, Acetylfuran, 5-Hydroxy-5,6-dihydromaltol (DHM) und Maltol gebildet.



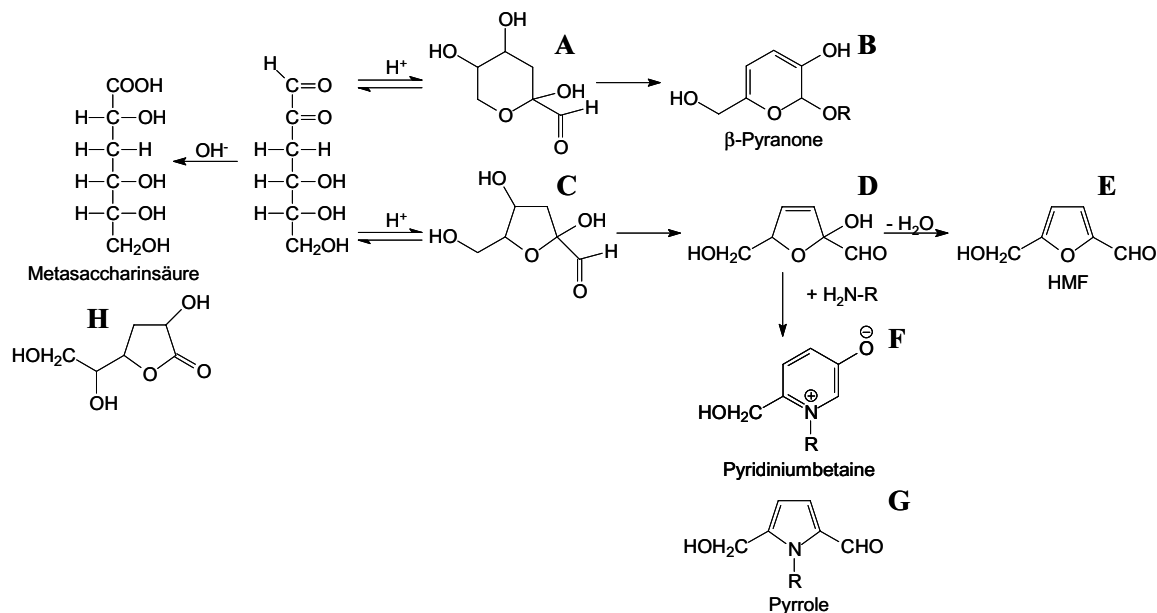
**Abbildung 1.9**  
Abbauwege des 1-Desoxyosons (nach [151])

Die Bildung von Maltol und Isomaltol erfolgt nur aus reduzierenden Disacchariden, da in diesen die Hydroxylfunktion am C<sub>4</sub> durch den glykosidisch gebundenen Zuckerrest blockiert ist und so die Cyclisierung an anderen Positionen erfolgt. Aus  $\alpha$ -glykosidisch verknüpften Disacchariden wird Maltol, aus  $\beta$ -glykosidisch verknüpften Disacchariden Isomaltol gebildet [Lit. 151]. Da DHM nur aus Monosacchariden gebildet wird, sind die drei Verbindungen

DHM, Maltol und Isomaltol als Marker für den Abbau von Mono- bzw. Disacchariden zu betrachten.

Das 3-Desoxyoson ist zwar deutlich stabiler als das 1-Desoxyoson, im Sauren reagieren die 3-Desoxyosone der Hexosen jedoch rasch, ausgehend vom entsprechenden Hydroxypyranonen, (Abb. 1.10, A) zu  $\beta$ -Pyranonen (B) und, ausgehend von Hydroxyfuranon (C), zu 5-Hydroxymethylfurfural (HMF, E). HMF ist das Hauptfolgeprodukt des 3-Desoxyosons und wird daher häufig als Markersubstanz für den 1,2-Enolisierungsweg im Verlauf der Maillard-Reaktion betrachtet. Aus Pentosen bildet sich über einen analogen Reaktionsweg Furan-2-aldehyd. Liegen größere Mengen an intermediär gebildetem Ammoniak, primären Aminen oder Aminosäuren vor, kommt es hauptsächlich zur Bildung von Pyrrol- und Pyridinderivaten [Lit. 151]. Es entstehen neben Pyridiniumbetainen (Abb. 1.10, F) bevorzugt 2-Formyl-5-hydroxymethylpyrrole (G). Die Bildung von E, F und G verläuft über ein 3,4-Didesoxyoson (D) als reaktivem Intermediat.

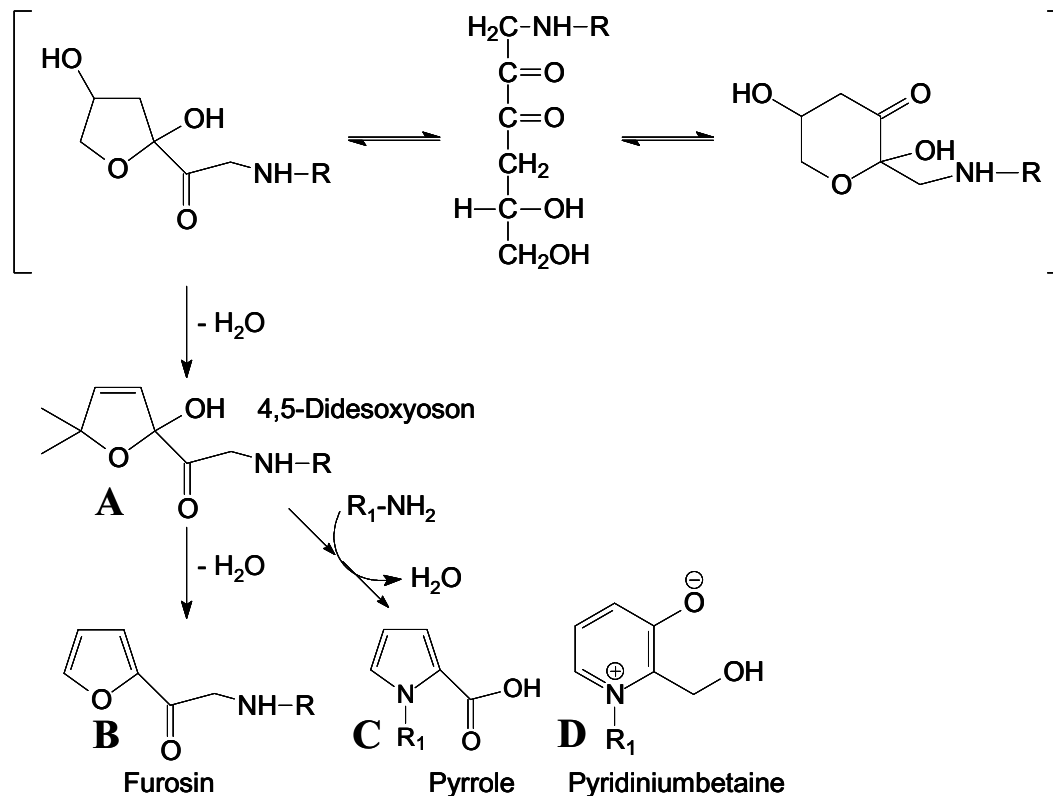
Im basischen Bereich bilden sich aus dem 3-Desoxyoson vor allen die Metasaccharinsäure, die zumeist in Lacton-Form (H) vorliegt.



**Abbildung 1.10**  
Abbauwege des 3-Desoxyosons (nach [Lit. 151])

Beim Abbau von 4-Desoxyosonen, deren Nachweis bis heute noch nicht gelungen ist [Lit. 181], entsteht hauptsächlich Furosin (siehe Abb. 1.11, B). Das reaktive Intermediat ist hierbei ein 4,5-Dideoxyoson (A) [Lit. 23], das bei größeren Mengen an Aminen mit diesen zu dem entsprechenden Pyrrol (C) und zum Pyridiniumbetain (D) reagieren kann [Lit. 151].

Des Weiteren können  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit Aminosäuren unter Transaminierung und Decarboxylierung zu den sensorisch sehr bedeutenden Strecker-Aldehyden [Lit. 84] reagieren. Hierbei reagieren Aminosäuren mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen wie den Desoxyosonen (vgl. hierzu Abb. 1.12) in einem ersten Schritt zu einer SCHIFF'schen Base (A), die leicht

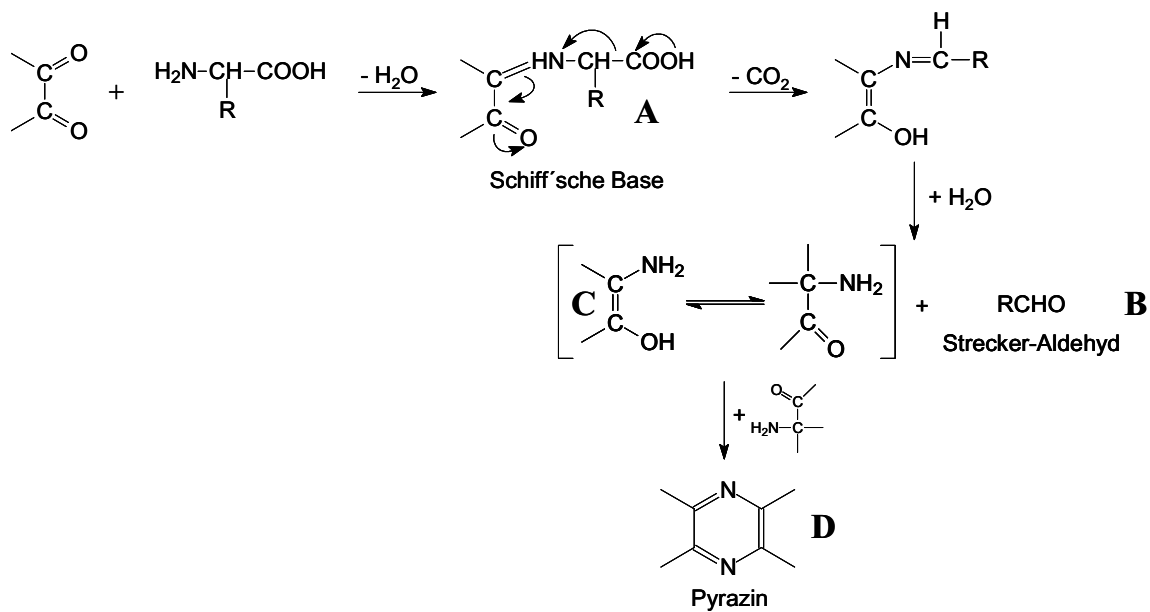


**Abbildung 1.11**  
Abbaupfade von 4-Desoxyosonen (nach [151])

Kohlendioxid abspaltet. Unter Transaminierung und hydrolytischer Spaltung entstehen daraus Strecker-Aldehyde (B) und  $\alpha$ -Aminoketone (C) [Lit. 16]. Beim Vorliegen größerer Mengen an freien Aminosäuren und erhöhten Temperaturen läuft diese Reaktion bevorzugt ab. Die beim Strecker-Abbau gebildeten  $\alpha$ -Aminoketone können zu Pyrazinen kondensieren (Abb. 1.12, D). Da die reduktive Aminierung von  $\alpha$ -Dicarbonylen zu  $\alpha$ -Aminoketonen hohe Aktivierungsenergien benötigt, werden Pyrazine erst ab 100 °C gebildet. So wird das Aroma von stärker erhitzten Lebensmitteln wie gebratenem Fleisch, Brot, Kaffee, Kakao oder gerösteten Nüssen maßgeblich durch Pyrazine bestimmt.

Ein weiterer Reaktionsweg, der zur Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylen führt, ist die Autoxidation von Amadori-Verbindungen, die erstmals umfangreich von Kawakishi et al. [Lit. 129] untersucht wurde. Da dieser oxidative Abbau in direkter Konkurrenz zu den 1,2- und 2,3-Enolisierungsreaktionen steht, haben die Reaktionsbedingungen einen maßgeblichen Ein-

fluss auf den jeweils eingeschlagenen Reaktionsweg (vgl. zu den Arbeiten von Liedke [Lit. 159]). Unter Einstellung geeigneter Reaktionsbedingungen gelang es Kawakishi, das Glucoson, eine Hexodiulose, direkt in Reaktionsgemischen sowie auch in Form des mit OPD abgefangenen Chinoxalinderivates nachzuweisen. Der hierbei wirksam werdende Reaktionsmechanismus



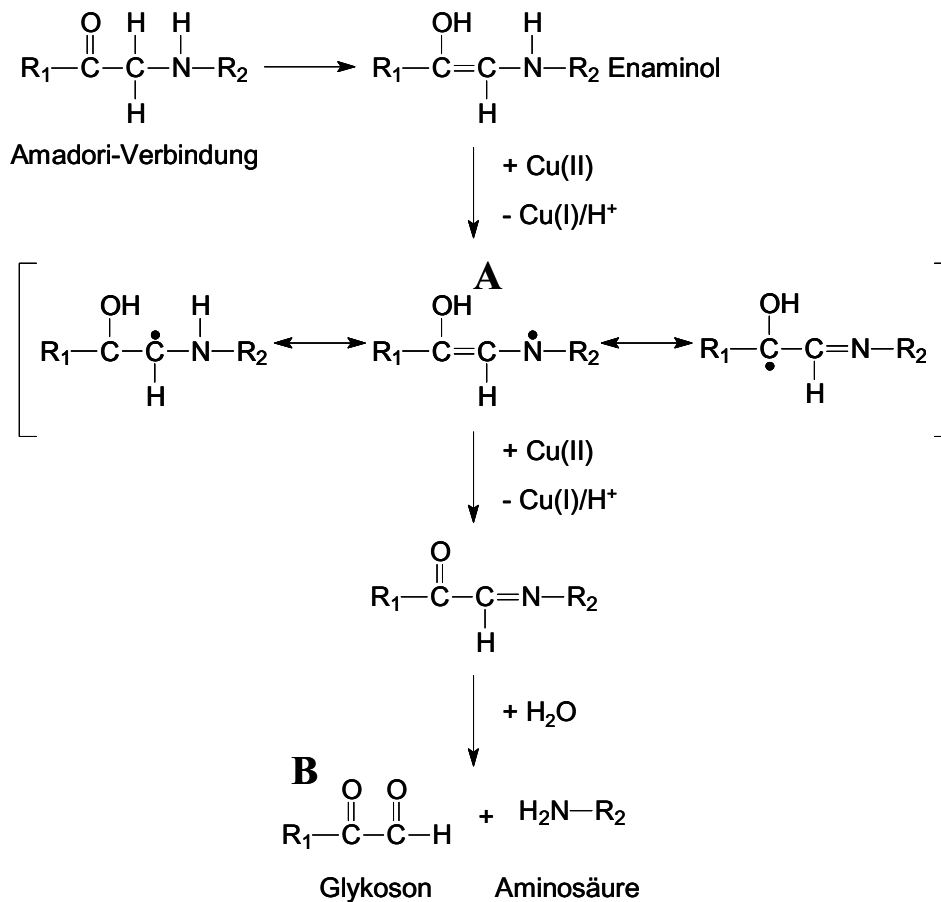
**Abbildung 1.12**  
STRECKER-Abbau von Aminosäuren

konnte noch nicht genau geklärt werden, jedoch postulierte Kawakishi einen metallkatalysierten, radikalischen Reaktionsmechanismus, der von der Enaminolform der Amadori-Verbindung ausgeht und zum korrespondierenden Glykoson führt (vgl. Abb 1.13, B). Dabei verläuft der Reaktionsweg über eine metallkatalysierte Bildung einer radikalischen Zwischenstufe, deren ungepaartes Elektron über ein mesomeres System stabilisiert wird (A). Im Rahmen der Metallkatalyse kann das Superoxidradikal, das zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) zählt, als Nebenprodukt gebildet werden.

Ein weiterer oxidativer Abbau von Amadori-Verbindungen ist über eine Endiolform als Zwischenstufe möglich. Über diesen Abbauweg kann z. B. die erstmals von Ahmed et al. [Lit. 4] beobachtete Bildung von N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysin (CML) als Abbauprodukt der Amadori-Verbindung aus Glucose und Lysin erklärt werden.

### 1.1.1.2 Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen

Pentosen sind in Fleisch und Fleischprodukten in größerer Menge enthalten als in anderen Lebensmitteln. Daher haben die Pentosen in solchen Produkten eine wichtige Bedeutung bei stofflichen Veränderungen im Rahmen der Maillard-Reaktion. Da der Verlauf der Maillard-Reaktion maßgeblich die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine beeinflusst (vgl. Kapitel 1.1.3), ist es wichtig, den Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen zu kennen.



**Abbildung 1.13**

Bildungsweg der Glykosone über den autoxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen (nach [129])

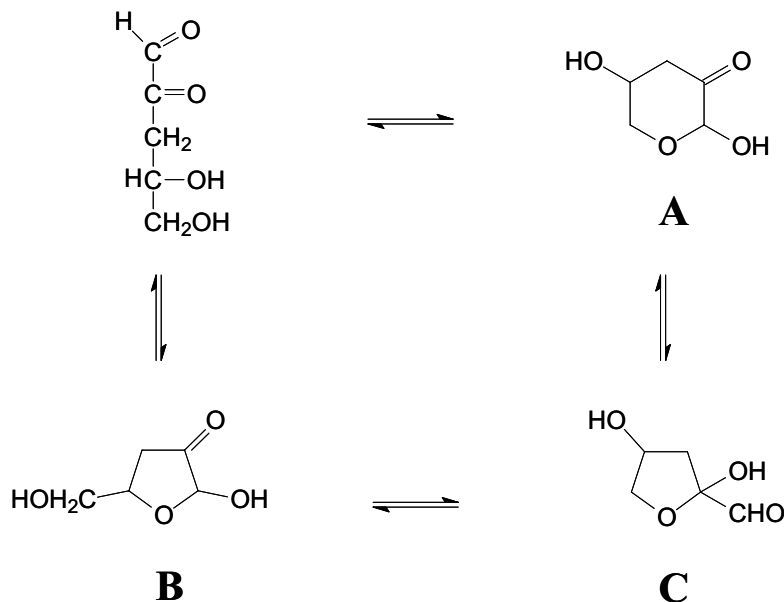
Die in der Literatur beschriebenen Forschungsergebnisse über die Maillard-Reaktion von Pentosen wurden fast ausschließlich aus gepufferten, wässrigen, nur Pentose und Aminosäure- bzw. nur Pentose und Carbonylkomponenten enthaltenden Modellsystemen gewonnen. Insbesondere die beim Abbau von Pentosen als Zwischenprodukte der Maillard-Reaktion gebildeten Desoxyaldo- und Desoxydiketoverbindungen stellen wichtige Carbonylkomponenten dar. Cyclisierungen, Enolisierungen, Kondensations- und C-C-Spaltungsreaktionen führen zu einem breiten Spektrum an Folgeverbindungen, die ebenfalls zum großen Teil Carbonyl-



funktionen aufweisen. Da diese Folgeprodukte sehr reaktiv sind und mit weiteren Nahrungsbestandteilen wie Proteinen Reaktionen eingehen können, sind die zur ihrer Bildung führenden Reaktionen häufig Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Beispielhaft sind hierfür die Arbeiten von Glomb [Lit. 68] zum Nachweis reaktiver Pentoseabbauprodukte, von Hofmann [Lit. 99] über die Bestimmung von Bräunungsvorstufen aus Reaktionsansätzen von Pentosen mit L-Alanin und von Frank [Lit. 60] zur Charakterisierung von Bräunungsprodukten und Bitterstoffen aus Pentose/Aminosäure-Reaktionen zu nennen.

Die Amadori-Verbindungen der Pentosen werden durch 1,2- bzw. 2,3-Enolisierungen und Wasserabspaltung zu den 3-Desoxypentosulosen bzw. 1-Desoxydipentulosen abgebaut. Neben diesen im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehenden Dicarbonylverbindungen von Pentosen gibt es natürlich vorkommende Desoxypentulosen. Aufgrund fehlender  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur sind diese jedoch weniger reaktiv. Der wichtigste Vertreter ist in diesem Zusammenhang die 1-Desoxy-D-xylulose, die einen Precursor von Vitamin B<sub>1</sub> und Vitamin B<sub>6</sub> in Bakterien darstellt [Lit. 132].

Die 3-Desoxypentosulosen liegen in Lösung in drei mesomeren cyclischen Formen vor (Abb. 1.14). Das bekannteste Abbauprodukt ist Furan-2-aldehyd (Furfural) [Lit. 11, 227]. Es entsteht in größeren Mengen und ist häufig an weiteren Kondensationsreaktionen mit anderen Carbonylkomponenten beteiligt. Die Bildung des Furan-2-aldehyds wird über die cyclische Zwischenstufe A, Ringöffnung, Enolisierung und Dehydratisierung formuliert.

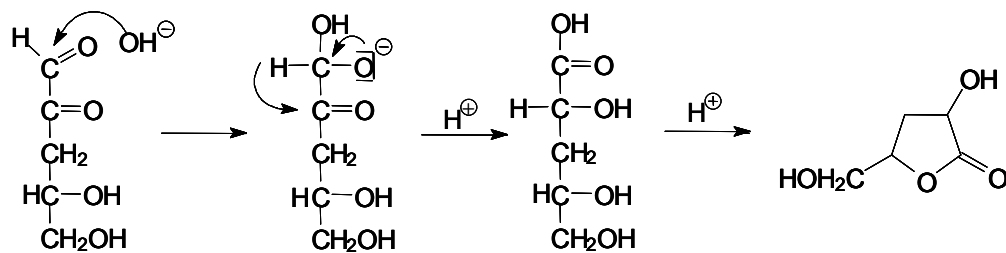


**Abbildung 1.14**  
Mesomere Formen von 3-Desoxypentosulosen

Ferner ist im alkalischen Milieu ein Abbau von 3-Desoxypentosulosen zu Lactonen bekannt (siehe Abb. 1.15) [Lit. 109]. Die Bildung des Lactons wird über eine intramolekulare CANNI-

ZARRO-Reaktion formuliert [Lit. 163]. Das Lacton hat jedoch eine zu schwache Methylenaktivität, um unter üblichen Koch- und Bratbedingungen mit weiteren Reaktionspartnern zu kondensieren und ist daher eher als Nebenprodukt anzusehen.

In Analogie zum Reaktionsverhalten von Hexosen können auch 1-Desoxyosone entstehen. Dabei bilden sich bei Pentosen über das 2,3-Enaminol nach  $\beta$ -Eliminierung die entsprechenden 1-Desoxydipentulosen. Über ein cyclisches Halbacetal kann 4-Hydroxy-5-methyl-2H-furan-3-on (Norfuraneol) entstehen [Lit. 252].



**Abbildung 1.15**

Abbau von 3-Desoxypentulosen zu entsprechenden Lactonen

Neben den dargestellten Folgereaktionsprodukten der 3-Desoxypentulose entstehen auch Sekundärprodukte, bei denen die intakte Aminosäure in die Verbindung eingebaut wird. Kato [Lit. 125] konnte aus einer Reaktion von Xylose mit Glycin 2-(Formylpyrrol-1-yl)-essigsäure nachweisen. Auch eine Kondensation zu einem Pyridiniumbetain ist denkbar. Aus diesen und weiteren Reaktionsintermediaten der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen entstehen zahlreiche weitere nichtflüchtige Sekundärprodukte, die wiederum zu niedermolekularen Bräunungsprodukten abreagieren. Severin et al. [Lit. 251] beschreiben erstmals die Isolierung eines gelben Farbstoffes aus einer erhitzten Lösung von Xylose und Isopropylammoniumacetat. Modellexperimente (vgl. Abb. 1.16) ergaben, dass das hierbei gebildete 2-(2-Furylmethyliden)-4-hydroxy-5-methyl-2H-furan-3-on (C) aus einer Kondensationsreaktion von Furan-2-aldehyd (A) und dem methylenaktiven Norfuraneol (B) entsteht, die beim Erhitzen der genannten Modell-Lösung zunächst gebildet werden [Lit. 101].

Das Kondensationsprodukt zeichnet sich durch eine aktivierte Methylgruppe aus, die mit einem weiteren Molekül Furan-2-aldehyd zu dem rot gefärbten 2-(2-Furylmethyliden)-4-hydroxy-5-[(E)-2-(furyl)-methyliden]-methyl-2H-furan-3-on (D) kondensieren kann [Lit. 102]. Lässt man Norfuraneol mit weiteren intermediär gebildeten reaktiven Zwischenstufen der frühen Maillard-Reaktion von Pentosen wie Acetaldehyd, Aceton, Hydroxyaceton, 2-Oxopropanal, Furan-2-aldehyd, Pyrrolaldehyd in Modellansätzen reagieren, so bilden sich Kondensationsfarbstoffe des gleichen chromophoren Typs (vgl. Abb. 1.17) [Lit. 153].

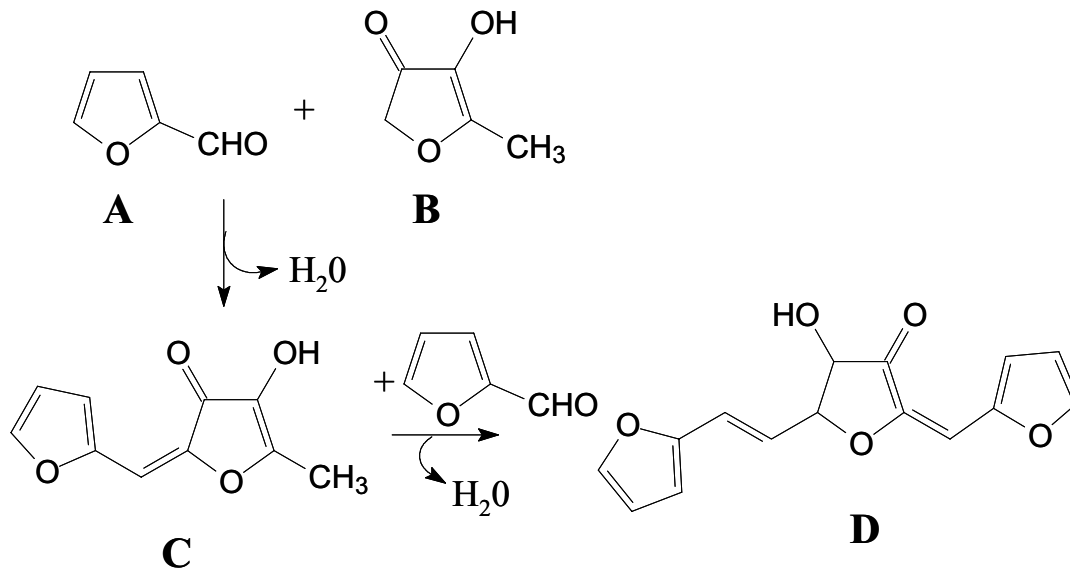


Abbildung 1.16

Reaktion von Furan-2-aldehyd (A) und Norfuranol (B) zu einem Kondensationsfarbstoff

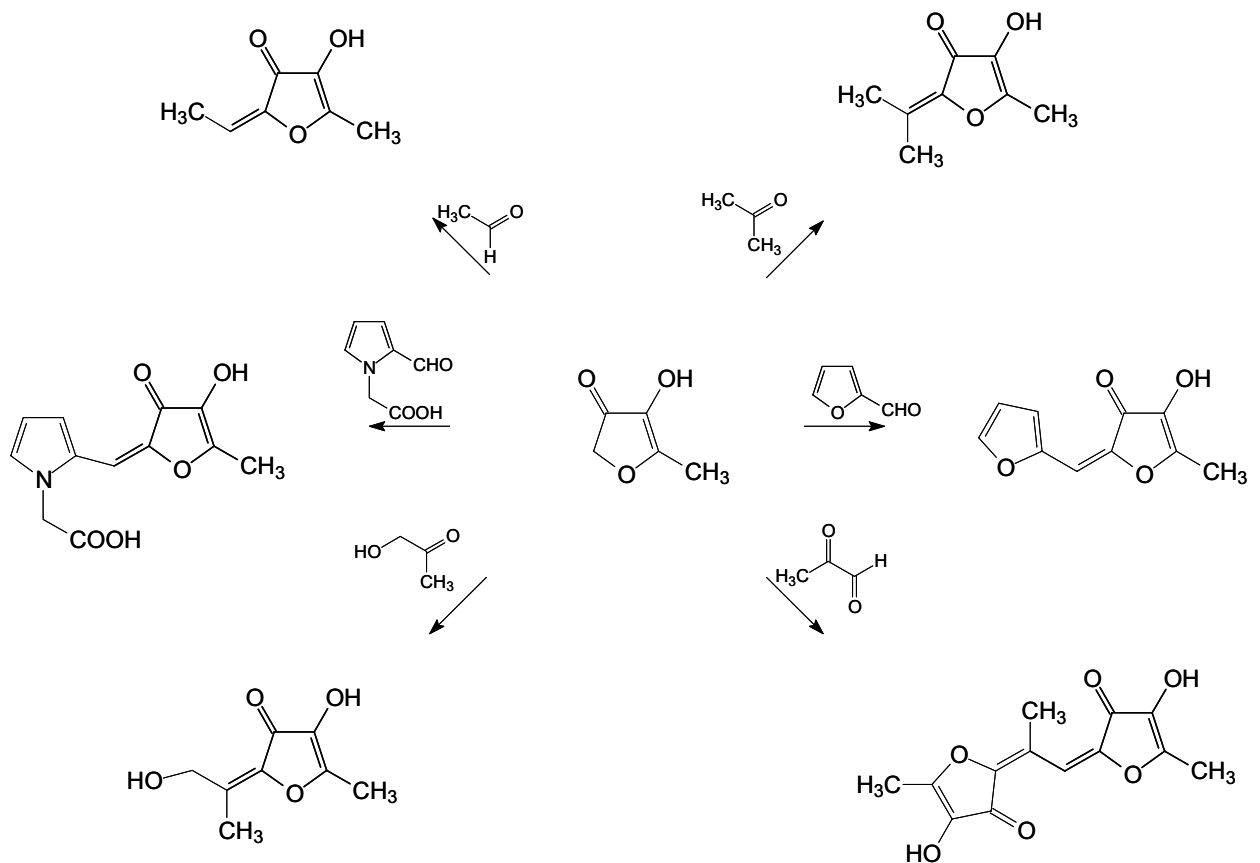
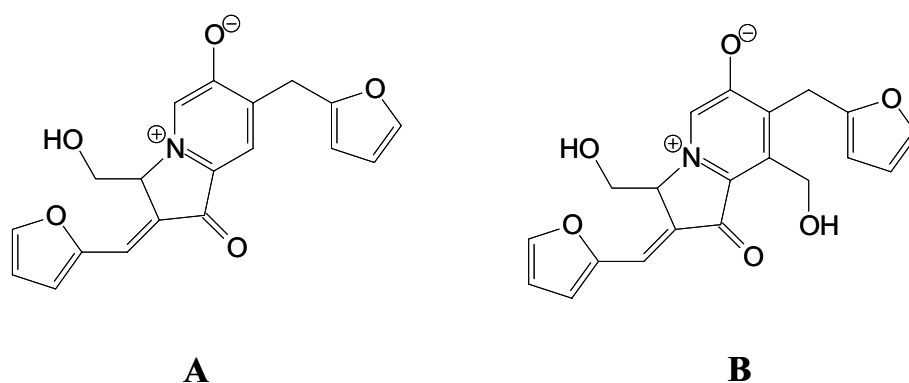


Abbildung 1.17

Reaktion von Norfuranol und weiteren Intermediaten der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen zu Kondensationsfarbstoffen

Ledl und Schleicher [Lit. 251] postulierten, dass die Kondensation methylenaktiver Maillardintermediate mit Carbonylkomponenten ein generelles Reaktionsprinzip der nicht-enzymatischen Bräunung darstellt.

Neben der Bräunungsaktivität spielt Furan-2-aldehyd eine wichtige Rolle als Schlüsselprecursor bei der Bildung von Bitterstoffen in Xylose/L-Alanin-Reaktionsmischungen [Lit. 60]. In seinen Arbeiten konnte Frank daraus die bislang unbekanntenen Bitterstoffe (E)-2-[(Furyl)-metyliden]-7-[(2-furyl)-methyl]-3-hydroxymethyl-1-oxo-1*H*,2*H*,3*H*-indolizinium-6-olat (Abb. 1.18, A) und (E)-2-[(Furyl)-metyliden]-7-[(2-furyl)-methyl]-3,8-bis-(hydroxymethyl)-1-oxo-*H*,2*H*,3*H*-indolizinium-6-olat (Abb. 1.18, B) nachweisen und ursächlich für die Bitterkeit einer Xylose/L-Alanin-Reaktionsmischung verantwortlich machen.



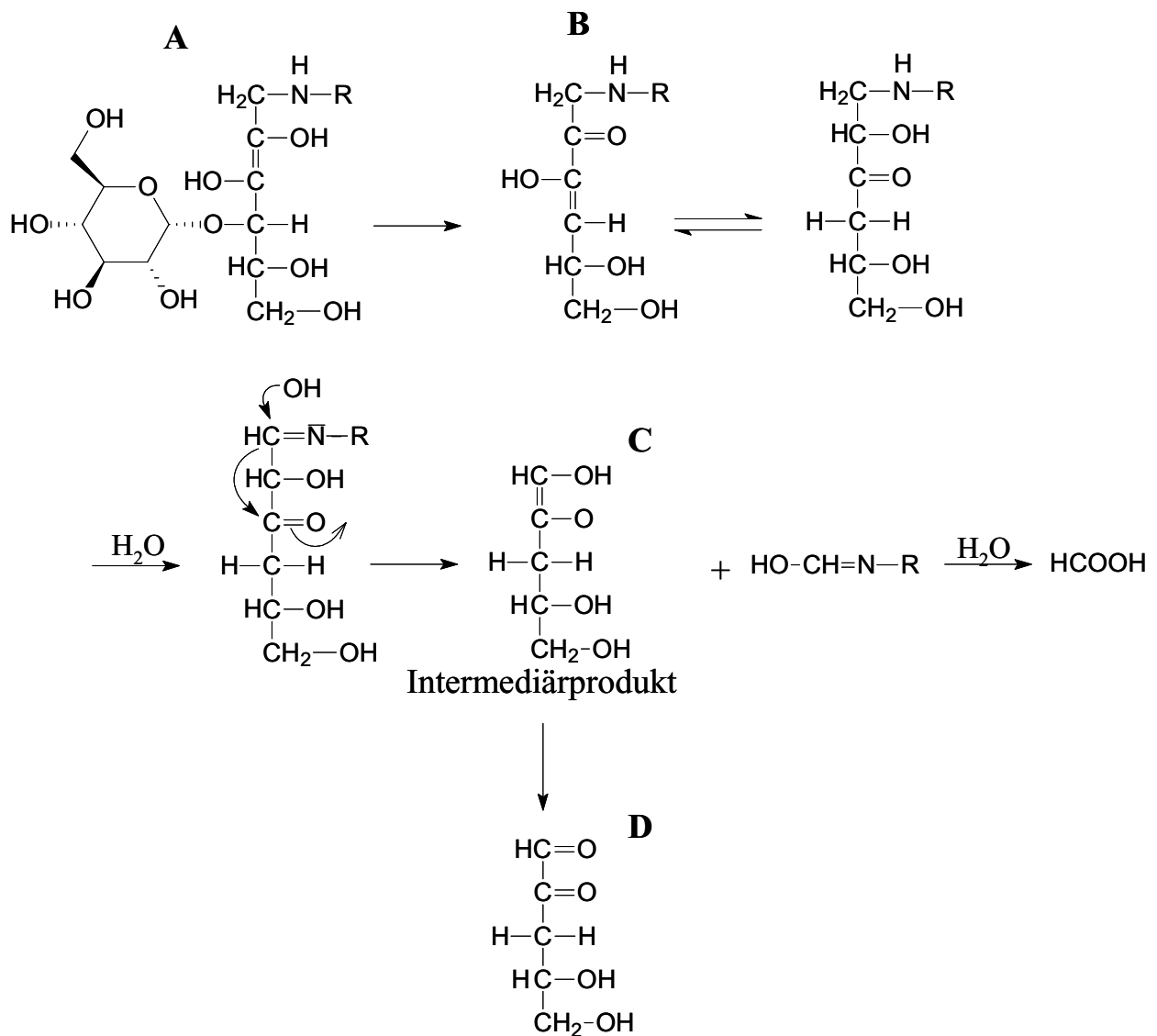
**Abbildung 1.18**

Bitterstoffe isoliert aus gepufferten Xylose-L-Alanin-Reaktionsmischungen

Neben dem Abbau intermediär gebildeter Pentose-Amadori-Verbindungen über Enolisierungsreaktionen zu 1- bzw. 3-Desoxypentosulosen ist auch eine Autoxidation wie bei der entsprechenden Hexose-Amadori-Verbindung denkbar (vgl. Liedke [Lit. 159]). Gemäß dem Postulat von Kawakishi [Lit. 132] könnte dabei auf radikalischem Wege ein Pentoson entstehen. Anhand von Reaktionsmodellen mit ortho-Phenylendiamin als Trapping-Reagenz konnte Hofmann [Lit. 99] zeigen, dass bei Erhitzung einer wässrigen Lösung von Xylose mit einem Zusatz von L-Alanin neben merklichen Mengen an 1- bzw. 3-Desoxyxylosenen auch 2-Xylosulose entsteht. Ferner konnte er den weiteren Abbau der Pentose-Dicarbonylverbindungen zu Furan-2-aldehyd (Furfural), Glyoxal, 2-Oxopropanal (Methylglyoxal) und Hydroxy-2-propanon (Hydroxyaceton) beobachten.

Ausgehend von den Arbeiten von Troyano et al., die in Milch und Maltose-Modellsystemen im alkalischen Milieu die Bildung von 3-Desoxypentosulosen beobachteten [Lit. 295], postulierten Hollnagel et al. [Lit. 104] einen alternativen Bildungsweg für 3-Desoxypentosulosen über den nicht-enzymatischen Abbau von Oligosacchariden in wässriger Lösung (Abb. 1.19). Der Reaktionsweg geht dabei von der Amadori-Verbindung

der Maltose (A) aus. Das entsprechende 2,3-Endiol reagiert unter  $\beta$ -Eliminierung von D-Glucose zu 1-Amino-1,4-dideoxyglucosulose (B). Durch Keto-Enol-Tautomerie wird eine Retro-Claisen-Kondensation begünstigt. Dabei wird der Aminorest sowie Formaldehyd abgespalten. Es entsteht ein intermediär gebildetes Pentosederivat (C), das sofort unter dem Einfluss von Sauerstoff und sonstigen Oxidationsmitteln zu dem 3-Desoxyoson der Xylulose (D) abreagiert.



**Abbildung 1.19**

alternativer Bildungsweg von 3-Pentosulosen über den nicht-enzymatischen Abbau von Oligosacchariden (nach Hollnagel und Kroh)

Der von Hollnagel und Kroh postulierte Bildungsweg zeigt, dass Abbauprodukte von Pentosen auch beim Abbau von Oligosacchariden z. B. im Rahmen von Karamelisierungsprozessen entstehen können.

### 1.1.2 Bildung und Vorkommen von heterocyclischen aromatischen Aminen in der Umwelt und in Lebensmitteln

In eigenen Arbeiten soll versucht werden, den Einfluss der Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen speziell im Hinblick auf die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine (HAAs) zu klären. Zunächst ist es unabdingbar, das Vorkommen von HAAs in Lebensmitteln zu untersuchen. In den vergangenen 25 Jahren wurden hierzu zahlreiche Studien und Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde unter anderem festgestellt, dass HAAs ubiquitär vorkommende Umweltkontaminanten darstellen. Die bisher bekannten HAAs wurden aus erhitzten Lebensmitteln oder als Pyrolyseprodukte von Aminosäuren bzw. Proteinen isoliert und anschließend identifiziert. Man kann die HAAs in Stoffklassen mit unterschiedlicher Grundstruktur und den daraus resultierenden Eigenschaften in drei Hauptgruppen einteilen. Die ersten Vertreter der Pyridoindole und Pyridoimidazole, die auch als Aminocarboline zusammengefasst werden, konnten – wie bereits beschrieben – im Rauchkonzentrat von gebratenem Fleisch und Fisch durch Sugimura et al. [Lit. 277] und Nagao et al. [Lit. 202] nachgewiesen werden. Weitere Hauptgruppen bilden HAAs mit Chinolin- und Chinoxalingrundstruktur sowie HAAs mit Pyridingrundstruktur [Lit. 235]. Die Vertreter der beiden letztgenannten Hauptgruppen entstehen bereits bei Temperaturen, die bei der haushaltsüblichen Zubereitung von Lebensmitteln verwendet werden, [Lit. 82] und werden deshalb in der englischsprachigen Literatur auch „thermic mutagens“ genannt; oft werden sie auch in der Gruppe der Aminoimidazoazaarene zusammengefasst. Die entsprechenden IUPAC-Bezeichnungen sind im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

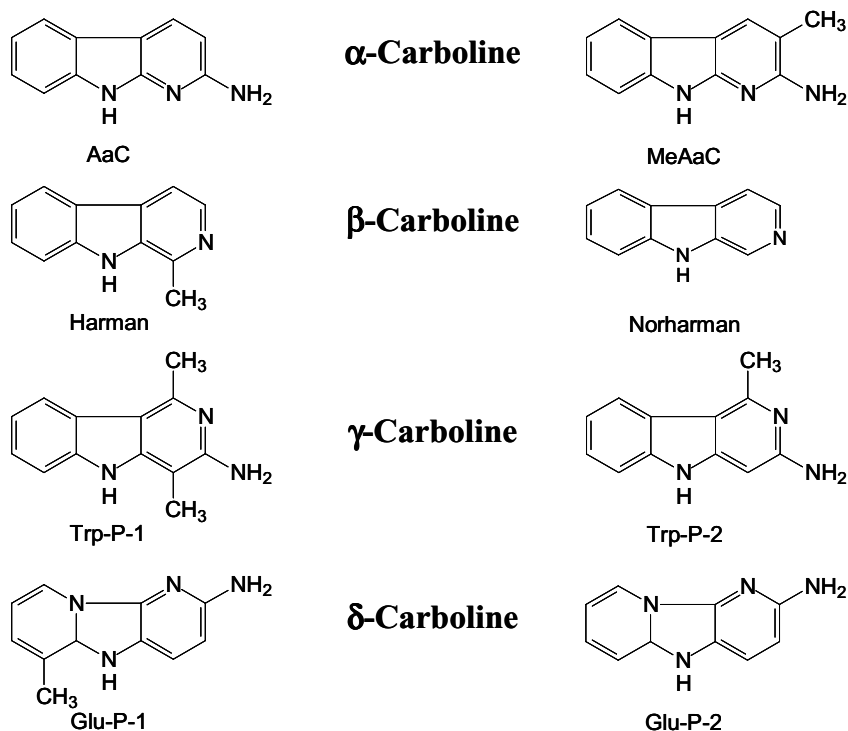
#### 1.1.2.1 Chemische Strukturen der heterocyclischen aromatischen Amine

##### A Pyridoimidazole und Pyridoindole

Im Hinblick auf die chemische Struktur sind Pyridoindole durch ein Ringgerüst gekennzeichnet, das einen Indol- und Pyridinkern beinhaltet. Pyridoimidazole haben im Ringgerüst neben dem Pyridinkern noch einen Imidazolring. Abhängig von der Stellung des Pyridinkerns werden die Verbindungen auch als  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, oder  $\delta$ -Carboline bezeichnet (vgl. Abb. 1.20).

Yoshida et al. [Lit. 330] konnten erstmals die aus Pyrolysaten von Sojabohnen-Globulin isolierbaren  $\alpha$ -Carboline A $\alpha$ C und MeA $\alpha$ C charakterisieren. Harman und Norharman konnten von Gross und Grüter [Lit. 75] in gekochtem Fisch und gebratenem Schinken und von Manabe et al. [Lit. 176] in Sojasauce erstmals in größeren Mengen nachgewiesen werden. Diesen  $\beta$ -Carbolenen, denen die exocyclische Aminogruppe fehlt, wird eine Sonderrolle zugeschrie-

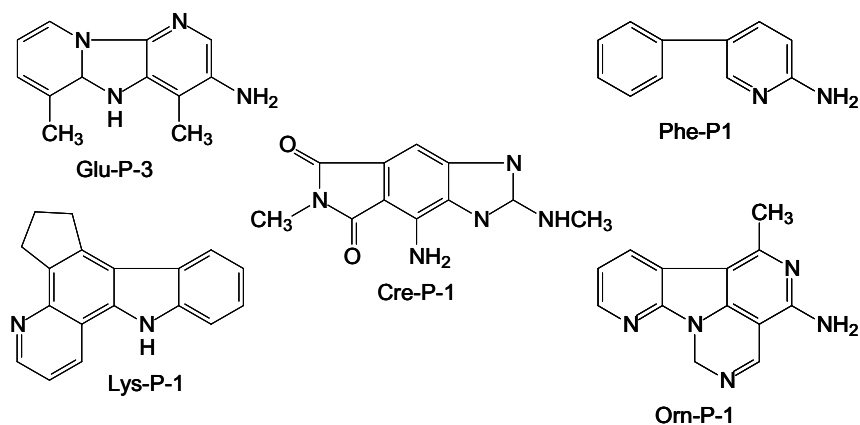
ben. Sie zeigen keine mutagene Aktivität im Ames-Test, sind allerdings Co-Mutagene in Gegenwart von Anilin [Lit. 83]. Die  $\gamma$ -Carboline Try-P-1 und Try-P-2, die ersten identifizierten HAAs, können im Rauchkondensat von Tryptophan [Lit. 276] und in gegrillten Sardinen [Lit. 322] nachgewiesen werden. Aus Glutaminsäurepyrolysaten konnten Yamamoto et al. [Lit. 324] die Aminodipyridoimidazole Glu-P-1 und Glu-P-2 ( $\delta$ -Carboline) isolieren und identifizieren. Wenig später konnten Yamaguchi et al. [Lit. 320] Glu-P-2 auch in gegrilltem Tintenfisch nachweisen.



**Abbildung 1.20**

Aminocarboline, eingeteilt nach Hatch et. al [Lit. 81]

Daneben gibt es noch weitere, zur Gruppe der Aminocarboline zählende mutagene Pyrolyseprodukte, die aber lediglich aus Modellsystemen isoliert werden konnten [Lit. 139] (vgl. Abb. 1.21). Orn-P-1 und Lys-P-1 werden durch Pyrolyse von Ornithin (Yokota et al. [Lit. 329]) bzw. Lysin (Wakabayashi et al. [Lit. 309]) gebildet. Nach Pyrolyse von Kreatin wurde Cre-P-1 durch Nukaya et al. [Lit. 212] als eines der wenigen sauerstoffhaltigen HAAs isoliert.

**Abbildung 1.21**

Weitere mutagene Pyrolyseprodukte, die aus Modellsystemen isoliert werden konnten

Zur Bildung der Aminocarboline ist noch relativ wenig bekannt [Lit 303]. Die zu ihrer Entstehung führende Pyrolyse benötigt Temperaturen oberhalb von 300 °C. Nach allgemeiner Auffassung [Lit. 114] müssen die bei diesen Temperaturen durch radikalische Reaktion gebildeten Fragmente miteinander kondensieren. Sie formen dann neue heterocyclische Strukturen. Oft lässt sich von den Strukturen der Aminocarboline auf die als Edukt fungierende Aminosäure schließen. Der genaue Mechanismus der Bildung ist jedoch noch nicht geklärt. So können in den eigenen Arbeiten keine weiteren Aussagen über den Gehalt von Norharman und Harman in Avicel-Modellsystemen gemacht werden, die unter Verwendung von Fleischextrakt hergestellt worden sind (vgl. Kapitel 3.10). Die Ausführungen an dieser Stelle beschränken sich auf die Beschreibung der Bildungsrate der beiden Aminocarboline.

Wenn im Nachfolgenden von HAAs und deren Bildungswegen berichtet wird, so sind damit vornehmlich die Aminoimidazoarene gemeint.

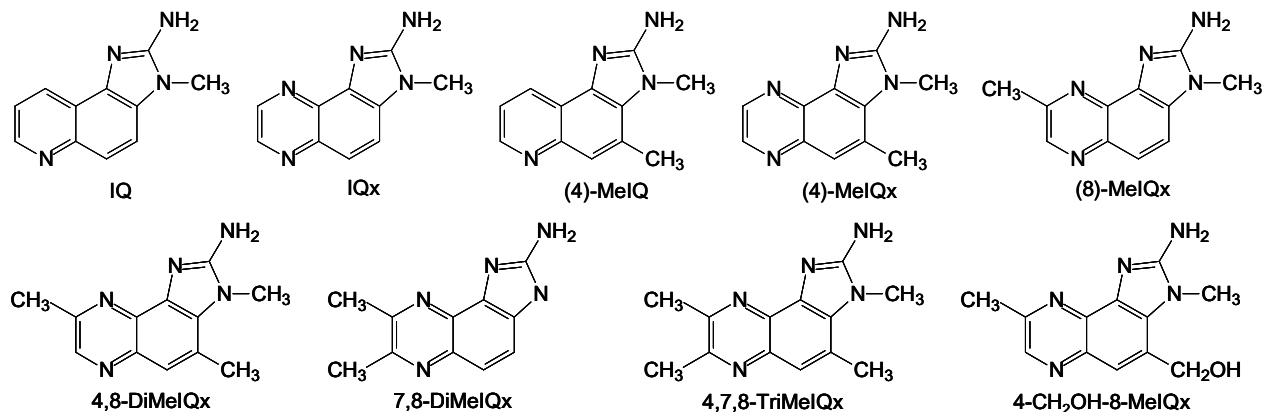
## B Chinoline und Chinoxaline

Chinoline und Chinoxaline stellen eine weitere Gruppe innerhalb der heterocyclischen aromatischen Amine dar. Sie treten in erhitzten Lebensmitteln bereits bei Temperaturen von weit unter 300 °C auf.

Die Strukturformeln der für die Belastung von Lebensmitteln relevanten HAAs sind in Abbildung 1.22 aufgezeigt. Die allgemein gebräuchlichen Bezeichnungen IQ und IQx stehen bei dieser Verbindungsklasse für Aminoimidazochinolin und Aminoimidazochinoxalin. Diese Verbindungen haben einheitliche chemische Grundstrukturen. Sie werden durch eine benzolische Grundstruktur mit jeweils unterschiedlicher Methylsubstitution, einen ankondensierten Imidazolring und eine Aminofunktion gekennzeichnet. Die entsprechenden Chinolin bzw. Chinoxalinkerne – eine Ausnahme bilden die Verbindungen IQ und IQx – sind mit bis zu drei



Methylgruppen substituiert, woraus sich die gebräuchlichen Trivialnamen (siehe Abb. 1.22) ableiten.



**Abbildung 1.22**

Strukturformeln von heterocyclischen aromatischen Aminen mit Chinolin- oder Chinoxalinstruktur

Die erstmalige Identifizierung der HAAs mit Chinolin- und Chinoxalin-Grundgerüst in entsprechenden Lebensmitteln ist in Tabelle 1.1 zu sehen.

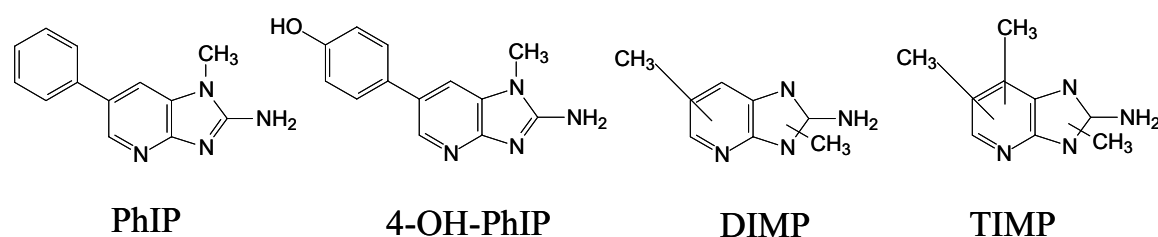
4,7,8-DiMeIQx ist außer in dem von Skog et al. beschriebenen Modell nicht in Lebensmitteln und Modellen nachgewiesen worden. Diese Verbindung eignet sich daher zum Einsatz als innerer Standard bei der quantitativen Bestimmung von HAAs.

## C Pyridine

Die Gruppe der HAAs mit Pyridin-Grundgerüst (vgl. Abb 1.23) wurde erst vor einigen Jahren umfassend charakterisiert [Lit. 235]. Hierzu zählen die Verbindungen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP), 2-Amino-n,n-dimethylimidazopyridin (DMIP) und 2-Amino-n,n,n-trimethylimidazopyridin (TMIP). Die Arbeitsgruppe um Felton [Lit. 53] konnte PhIP erstmals im Jahr 1986 von der Kruste gebratenen Rindfleisches isolieren und anschließend charakterisieren. PhIP konnte auch in Zigarettenrauch [Lit. 174] sowie in Wein und Bier [Lit. 173] nachgewiesen werden. Vollenbröcker [Lit. 307] konnte in seinen Arbeiten über das Vorkommen von HAAs in Malzen und Bieren zeigen, dass die Bildung von PhIP weitgehend unabhängig von den eingesetzten Malzen unterschiedlicher Provenienz, von der Temperaturführung während des Brauprozesses und von den eingesetzten Hefestämmen verläuft. Daher lag die Vermutung nahe, dass PhIP als Umweltkontaminante (z. B. aus Verbrennungsmotoren) ins Bier gelangt. In Fleischprodukten, die scharf angebraten wurden, konnten Felton et al. [Lit. 56] und Becher et al. [Lit. 18, 19] DMIP und TIMP nachweisen. Eine exakte Zuordnung der Positionen der Methylsubstituenten von DMIP und TIMP ist bislang noch nicht erfolgt. Die hydroxylierte Verbindung 4-OH-PhIP konnte durch Kurosaka et al.

[Lit. 148] charakterisiert werden. In gegrillten Sardinen wurde 2-Amino-5-phenylpyridin (Phe-P-1) nachgewiesen (Yamaizumi et al. [Lit. 322]). Genaue Bildungsmechanismen wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

Intensive Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen ergaben, dass Kreatinin und Phenylalanin Vorläufer für die Bildung von PhIP sind. Phenylalanin kann durch Leucin, Isoleucin und Tyrosin ersetzt werden [Lit. 117]. Glucose, die durch Nucleinsäuren [Lit. 172] und verschiedene Aldehyde [Lit. 174] in Modellsystemen ersetzt werden kann, hat zwar einen Einfluss auf die Bildung von PhIP [Lit. 262]; dieser kann aber nicht durch genaue Reaktionsverläufe beschrieben werden.



**Abbildung 1.23**

Strukturformeln von heterocyclischen aromatischen Aminen mit Pyridin-Grundgerüst

### 1.1.2.2 Vorkommen von HAAs in Lebensmitteln

Eine fachkundige Einstufung der Kontamination von Lebensmitteln mit HAAs ist im Beschluss der DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM [Lit. 35]) zu finden. Die tägliche Aufnahmemenge mit der Nahrung beträgt nach dem derzeitigen Erkenntnisstand nicht mehr als 1 µg pro Person und Tag. In küchenmäßig zubereiteten erhitzten fleischhaltigen Lebensmitteln können Gesamtgehalte von 10 µg HAAs/kg Lebensmittel vorliegen. In anderen nicht erhitzten Lebensmitteln kann man vielfach um eine Zehnerpotenz niedrigere Gehalte feststellen. Nach dem heutigen Stand der Technik unter Verwendung geeigneter Rohstoffe bei Temperaturen bis zu 160 °C hergestellte Reaktionsaromen sind mit bis zu 15 µg HAAs/kg belastet.

Die ersten genauen Untersuchungsreihen über Gehalte von HAAs in Lebensmitteln, meist in Fleisch- und Fischprodukten, sind erst Ende der Achtzigerjahre gemacht worden. Spezielle, auf die quantitative Analytik zugeschnittene HPLC-DAD-, HPLC-MS/MS- und GC-MS-Analysenverfahren ermöglichten eine präzise Bestimmung von HAAs. Zuvor wurden die Gehalte an mutagenen HAAs lediglich über die mutagene Aktivität verschiedener Lebensmittelhomogenisate im Ames-Test abgeschätzt. In zahlreichen umfangreichen Studien und Übersichtsartikeln (Skog, 1993, [Lit. 268]; Gross et al., 1993, [Lit. 45]; Eisenbrand und Tang, 1993

[Lit. 76]; Knize et al., 1998, [Lit. 142]; Skog und Solyakov, 2002, [Lit. 266]) finden sich gesammelte Literaturdaten über die HAA-Gehalte von erhitztem Fleisch und Fisch sowie von Fleischextrakten. In Tabellensammlung 1.2 finden sich gesammelte Literaturdaten zu den Gehalten einzelner HAAs, geordnet nach einzelnen Lebensmitteln.

Die Aminoimidazoazaarene IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx und PhIP sind in vielen gekochten und gebratenen Fleisch- und Fischprodukten nachweisbar. Die Aminocarboline A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Trp-P-1 und Try-P-2 sowie die Co-Mutagene Harman und Norharman in geringeren Gehalten bestimmbar. An stückigem Untersuchungsgut zeigte sich, dass HAAs primär an der krustigen Oberfläche und weniger im Inneren zu finden sind. In reinem erhitztem oder gebratenem Fleisch sind die bestimmten Gehalte an HAAs (fast) durchweg höher als in verarbeiteten Erzeugnissen wie Frikadellen oder Bratwürsten. Im Bratensatz sind hohe Gehalte an MeIQx, 4,8-DiMeIQx und PhIP bestimmbar (vgl. Skog et al. [Lit. 267]), weshalb es anzuraten ist, diesen nicht als Grundlage für Saucen weiterzuverwenden. In Fleischextrakten und daraus hergestellten Reaktionsaromen konnten ebenfalls HAAs nachgewiesen werden. Umfangreiche Erhebungen dazu wurden von Stavric et al. [Lit. 273] und Jackson et al. [Lit. 110] durchgeführt.

### 1.1.2.3 Vorkommen von HAAs in Umweltproben

HAAs können auch in Raumluft- und Umweltproben nachgewiesen werden [Lit. 235]. In den Dämpfen, die während der Zubereitung von erhitzten Lebensmitteln aufsteigen, konnten Thiébaud et al. [Lit. 288] neben Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAKs) weitere Verbindungen mit mutagenem Potential nachweisen. In systematischen Versuchen untersuchten Yang et al [Lit. 325] Raumluft von Großraumküchen. Unter definierten Bedingungen wurde Raumluft durch ein steriles Filter gesaugt. Rückstände von niedergeschlagenen Dämpfen und Schwebeteilchen wurden vom Filter gespült. Der so gewonnenen Suspension konnte im Ames-Test eine mutagene Aktivität zugeschrieben werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass diese maßgeblich durch MeIQx bestimmt wird.

Weiterhin wurde das Vorkommen von A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C und PhIP in Dieselabgasen beschrieben [Lit. 171, 177].

Manabe et al. [Lit. 177] konnten zahlreiche Aminocarboline und PhIP im Zigarettenrauch identifizieren. Im Großraum Tokyo sind die  $\gamma$ -Carboline Trp-P-1 und Trp-P-2 im Regenwasser und in Luftpartikeln nachgewiesen worden [Lit. 175]. Wu et al. [Lit. 316] beschreiben in

ihren Arbeiten jahreszeitliche Schwankungen der Gehalte an PhIP, Trp-P-1 und Trp-P-2, sowie 4,8-DiMeIQx im Regenwasser Singapurs.

Das ubiquitäre Vorkommen von HAAs in der Umwelt legt die Vermutung nahe, dass, wie von Manabe [Lit. 171] postuliert, bei Verbrennungsvorgängen HAAs gebildet werden.

Lebensmittel	Verbindung	Gehalt*	Methode	Literatur
Rindfleisch, gebraten	IQ	0,02	HPLC-UV	Felton et al. 1984 [Lit. 56]
	IQ	0,2-1,9	HPLC-TS-MS	Turesky et al. 1988 [Lit. 297]
	MelQx	0,45	HPLC + MS	Hargraves und Pariza 1983 [Lit. 78]
	MelQx	1,0	HPLC-UV	Felton et al. 1984 [Lit. 54]
	MelQx	1,3-2,4	GC-MS	Murray et al. 1988 [Lit. 199]
	MelQx	2,7-12,3	HPLC-MS	Turesky et al. 1988
	MelQx	0,87	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997 [Lit. 140]
	4,8-DiMeIQx	3,9	HPLC-MS	Turesky et al. 1988
	4,8-DiMeIQx	0,5-1,2	GC-MS	Murray et al. 1988
	4,8-DiMeIQx	1,3-2,0	HPLC-UV	Gross 1990 [Lit. 77]
	7,8-DiMeIQx	0,7	HPLC-MS	Turesky et al. 1988
	PhIP	23,5-48,5	HPLC-UV	Gross 1990
PhIP	13	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997	
Rindfleisch, gegrillt	IQ	0,5	HPLC-MS	Yamaizumi et al. 1986 [Lit. 321]
	IQx	1,5	HPLC-UV	Fay et al. 1997 [Lit. 50]
	MelQx	6,0	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	4,8-DiMeIQx	1,2	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	7,8-DiMeIQx	0,2	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	PhIP	14	HPLC-UV	Fay et al. 1997
Rinderhack, gebraten	IQ	0,3-1,9	HPLC-UV/FD	Skog 1993 [Lit. 261]
	MelQx	0,5-12,3	HPLC-UV/FD	Skog 1993
	PhIP	1-48	HPLC-UV/FD	Skog 1993
Hamburger (Proben)	MelQx	0,89	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997
	4,8-DiMeIQx	n.n-0,1	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1998 [Lit. 142]
	PhIP	1,8-18,4	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1998
	AaC	n.b.	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997
Schinken, geräuchert	MelQx	1,0-27	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997
	4,8-DiMeIQx	n.n-9,3	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997
	PhIP	n.n-36	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1997
Schinken aus Formfleisch, Mikrowelle (600W, 3')	MelQx	0,1	HPLC-UV	Gross et al. 1993 [Lit. 76]
	AaC	0,1	HPLC-UV	Gross et al. 1993
	Norharman	3,3	HPLC-UV	Gross et al. 1993
	PhIP	n.b.	HPLC-UV	Gross et al. 1993

#### Tabellensammlung 1.1

Vorkommen von HAAs in ausgewählten Lebensmitteln (Literaturrecherche),

\* Gehalte, wenn nicht anders angegeben in ng/g Lebensmittel

Lebensmittel	Verbindung	Gehalt*	Methode	Literatur
Schweinefilet	MelQx	n.b-4,6	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997 [Lit. 256]
	PhIP	n.b-13,4	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
	4,8-DiMelQx	n.n-3,3	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
Pfannenrückstand (Schweinefl.)	MelQx	0,06-5,6	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
	4,8-DiMelQx	0,08-4,2	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
	PhIP	0,3-32	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
Huhn, gegrillt (Holzkohle)	MelQx	n.b-9,0	HPLC-UV	Sinha et al. 1995 [Lit. 254]
	4,8-DiMelQx	n.b.-2,0	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
	PhIP	27-480	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
Huhn, gegrillt (Ofen)	MelQx	n.b-3,0	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
	4,8-DiMelQx	n.n.	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
	PhIP	6-150	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
Huhn, gebraten	IQ	0,1	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998 [Lit. 30]
	IQx	0,17	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998
	MelQ	1,11	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998
	MelQx	0,13	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998
	MelQx	1,0-3,0	HPLC-UV/FD	Sinha et al. 1995
	MelQx	0,4-0,5	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
	4,8-DiMelQx	0,09	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998
	4,8-DiMelQx	1,0-4,0	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
	4,8-DiMelQx	0,2-0,5	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997
	PhIP	0,21	HPLC-UV/FD	Chen und Yang 1998
	PhIP	12-70	HPLC-UV	Sinha et al. 1995
PhIP	0,5-10	HPLC-UV/FD	Skog et al. 1997	
Lamm, gegrillt	MelQx	1,6	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1998
	4,8-DiMelQx	n.b.	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1998
	PhIP	11	HPLC-UV/FD	Knize et al. 1998
Bratwurst (gemischt, gegrillt)	MelQx	n.b.-1,2	HPLC-UV/FD	Abdulkarim und Smith 1998 [Lit. 1]
	PhIP	n.b.-0,7	HPLC-UV/FD	Abdulkarim und Smith 1998
	Harman	0,2-0,8	HPLC-UV/FD	Abdulkarim und Smith 1998
	Norharman	0,5-3,1	HPLC-UV/FD	Abdulkarim und Smith 1998
	Trp-P-2	0,05-0,8	HPLC-UV/FD	Abdulkarim und Smith 1998
Lachs, gegrillt	IQ	0,2-0,4	HPLC-MS	Edmonds et al. [Lit. 39]
	MelQ	0,4-0,9	HPLC-MS	Edmonds et al.
	MelQx	1,4,-5	HPLC-UV/FD	Gross und Grüter 1992 [Lit. 75]
	PhIP	2-73	HPLC-UV/FD	Gross und Grüter 1992
Lachs (Ofen)	PhIP	n.b.-18	HPLC-UV/FD	Gross und Grüter 1992
Wein	PhIP	12-66 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991 [Lit. 176]
Bier	PhIP	9-25 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991

Tabellensammlung 1.1

Fortsetzung

\* Gehalte, wenn nicht anders angegeben in ng/g Lebensmittel

Lebensmittel	Verbindung	Gehalt*	Methode	Literatur
Sojasauce	Try-P-1	1,6-8 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991
	Try-P-2	2-26 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991
	AaC	4-10 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991
	MeAaC	5-11 ng/l	HPLC-FD	Manabe et al. 1991
Rindfleisch-extrakt	IQ	4,8-6,2	HPLC-UV	Turesky et al. 1989 [Lit. 299]
	MeIQx	<1-44	HPLC-UV	Gross 1990
	MeIQx	23-69	HPLC-UV	Turesky et al. 1989
	4,8-DiMeIQx	n.b-3,2	HPLC-MS	Turesky et al. 1988
	4,8-DiMeIQx	2,5-4,9	HPLC-UV	Gross 1990
Fleisch-extrakt	IQ		HPLC-UV	Schuirmann und Eichner 1991 [Lit. 245]
	IQ	3,0-15	HPLC-ESI-MS	Galceran et al. 1996 [Lit. 64] [Lit. 65]
	MeIQx		HPLC-UV	Schuirmann und Eichner 1991
	4,8-DiMeIQx	2,9-3,6	HPLC-UV	Schuirmann und Eichner 1991
	PhIP	3,0	HPLC-ESI-MS	Galceran et al. 1996
	AaC	2,1	HPLC-ESI-MS	Galceran et al. 1996
	Trp-P-1	4,0-5,5	HPLC-ESI-MS	Galceran et al. 1996
	Trp-P-2	5,0	HPLC-ESI-MS	Galceran et al. 1996
Fleischextr. (vakuum-getrocknet)	IQx	2,1	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	MeIQx	29	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	4,8-DiMeIQx	4,8	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	7,8-DiMeIQx	n.b	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	MeAaC	n.n	HPLC-UV	Fay et al. 1997
	PhIP	n.n	HPLC-UV	Fay et al. 1997
Fleischbouillion	MeIQx	0,6	GC-MS (NCI)	Murray et al. 1988
	4,8-DiMeIQx	0,3	GC-MS (NCI)	Murray et al. 1988
	PhIP	0,3	GC-MS (NCI)	Murray et al. 1988

**Tabellensammlung 1.1**

Fortsetzung

\* Gehalte, wenn nicht anders angegeben in ng/g Lebensmittel

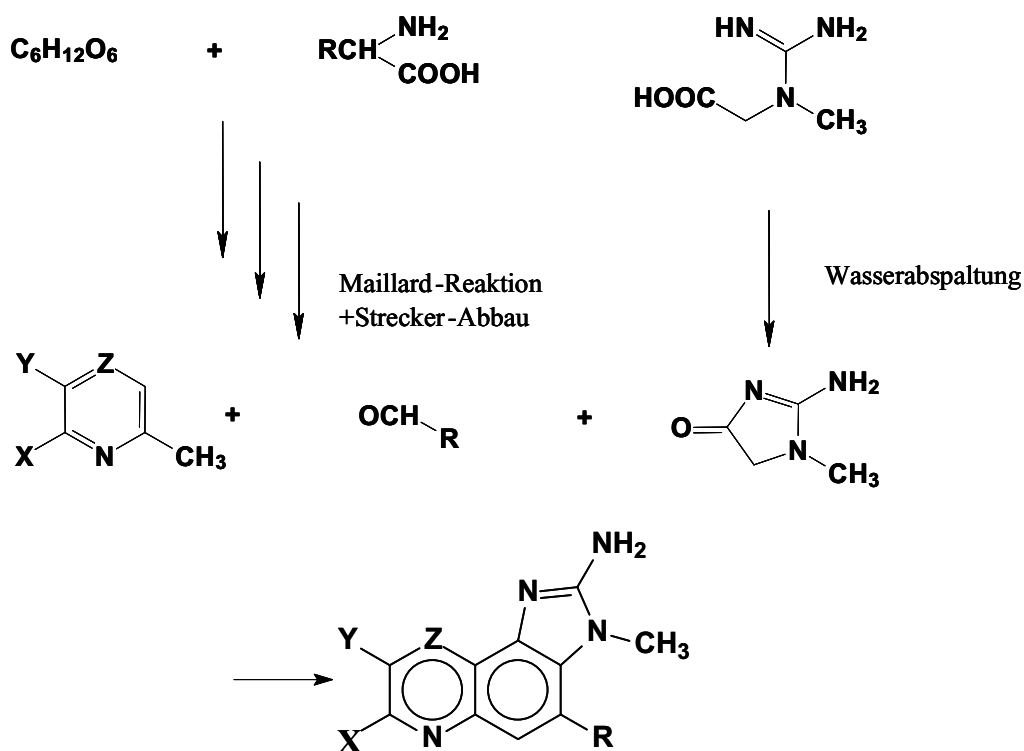
### 1.1.3 Vorgeschlagene Bildungswege von HAAs (Chinoline und Chinoxaline)

In systematischen Untersuchungen an gegrilltem Fleisch und Fisch unter Pyrolysebedingungen oberhalb von 300 °C konnten Nagao et al. [Lit. 202] und Matsomuto et al. [Lit. 180] eine Abhängigkeit der Bildung von Glu-P-1, Trp-P-1 und weiterer durch Pyrolyse entstehender HAAs vom Vorhandensein und der Menge an Aminosäuren wie Glutaminsäure, Tryptophan, Lysin und Serin feststellen. Genaue Bildungsmechanismen der primär unter Pyrolysebedingungen entstehenden Aminocarboline sind noch nicht bekannt.

Im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen in Lebensmitteln, die Kreatinin, reduzierende Zucker und Aminosäure enthalten bereits bei Temperaturen um 100 °C unerwünschte Kontaminanten der Gruppe der Aminoimidazoazaarene (AIAs), wie MeIQx oder 4,8-DiMeIQx.

Für ihre Entstehung gibt es zahlreiche unterschiedliche Bildungstheorien, die aus Untersuchungen an Glucose oder Fructose, Aminosäuren und Kreatin bzw. Kreatinin enthaltenden Modellsystemen abgeleitet wurden.

Jägerstad et al. [Lit. 268] untersuchten den Einfluss von Glucose und Kreatinin beim Braten von Fleischstücken auf die Bildung von HAAs. Die über den Ames-Test (vgl. Kapitel 1.1.1) messbare Mutagenität der homogenisierten gebratenen Fleischstücke war abhängig von der Menge an Glucose und Kreatinin, die dem Fleisch zugesetzt wurden. Es wurde vermutet, dass die HAAs aus Hexose, Kreatin(in) und Aminosäuren gebildet werden. Sie sind in Fleisch und Fisch vorhanden und reagieren im Rahmen der Maillard-Reaktion bei der Lebensmittelverarbeitung – insbesondere bei Erhitzungsprozessen – miteinander. Aus ihren Ergebnissen postulierten Jägerstad et al. erstmals, dass Aminoimidazochinoline und –chinoxaline aus Kreatin bzw. Kreatinin, Glucose oder Fructose und einer Aminosäure entstehen [Lit. 268]. Das von den Autoren vorgeschlagene Bildungsschema ist in Abb. 1.24 dargestellt.



	X	Y	Z	R
IQ	H	H	CH	H
MelQ	H	H	CH	$-CH_3$
MelQx	H	$-CH_3$	N	H
7,8-DiMelQx	$-CH_3$	$-CH_3$	N	H
4,8-DiMelQx	H	$-CH_3$	N	$-CH_3$

**Abbildung 1.24**

Von Jägerstad et al postulierter Bildungsweg für HAAs aus reduzierendem Zucker (hier Glucose), Glycin und Kreatin in einer Wasser/Ethylenglykolmatrix (mit  $Z = CH \rightarrow$ Pyridin-,  $Z = N \rightarrow$ Pyrazinderivat)

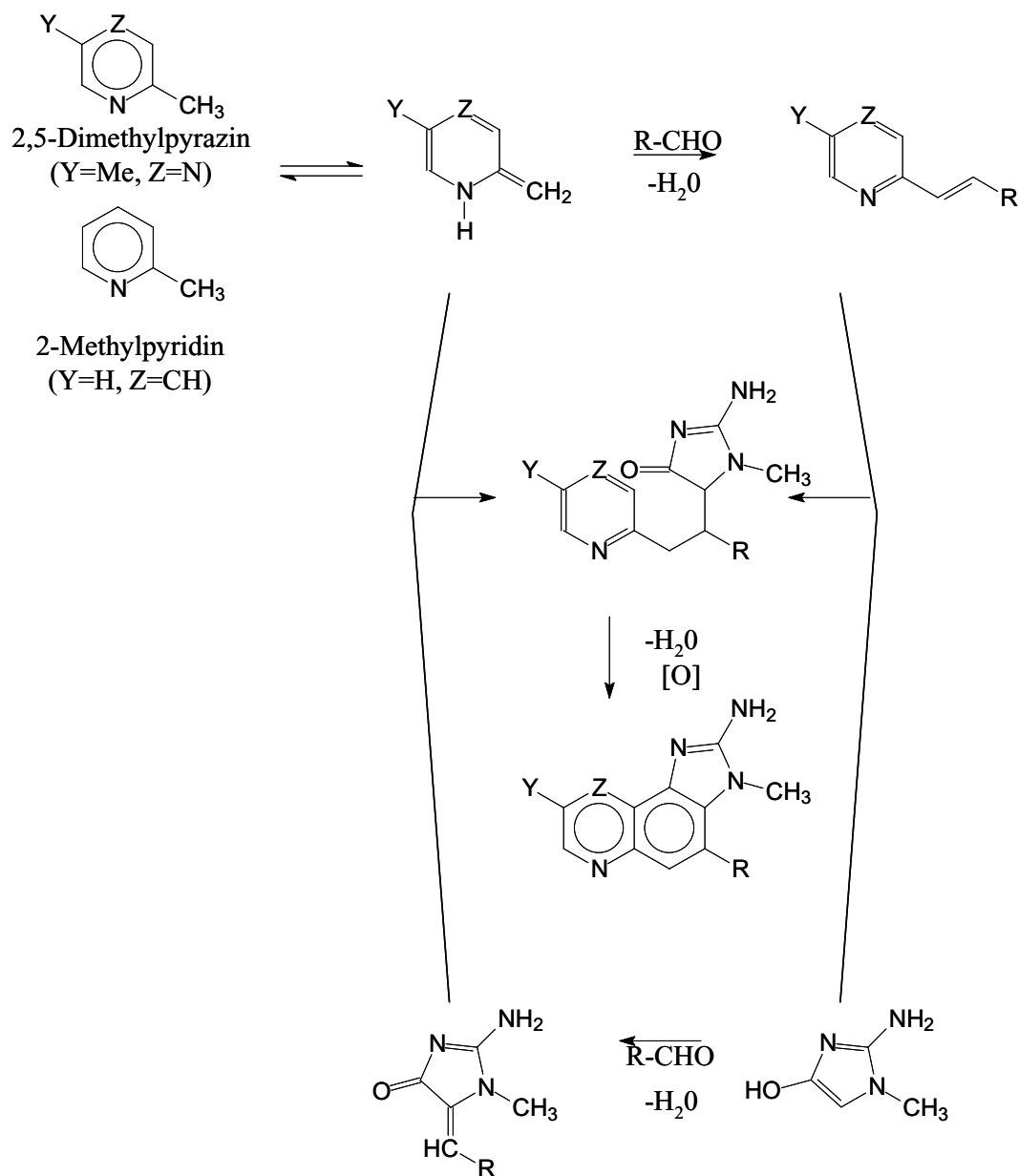
Dieser Bildungsweg ist allgemein anerkannt und ist sich auch in zahlreichen Lehrbüchern [Lit. 150]. Hierbei entstehen über die der Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren nachgeschaltete Strecker-Reaktion methylysubstituierte Pyridine und Pyrazine. Unter dem Begriff „Strecker-Reaktion“ fasst man die Reaktionen zwischen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, wie sie bei der Maillard-Reaktion z. B. als Desoxyosone entstehen, und Aminosäuren zusammen. Die Strecker-Reaktion führt unter oxidativer Decarboxylierung von  $\alpha$ -Aminosäuren und Freisetzung von  $\text{CO}_2$  zu so genannten Strecker-Aldehyden und  $\alpha$ -Aminoketonen, die wiederum zu Pyrazinen kondensieren können. Methylysubstituierte Pyridin- und Pyrazinderivate können mit Strecker-Aldehyden zu Vinylpyridinen bzw. -pyrazinen reagieren, die sich dann im Rahmen einer Aldolkondensation mit der Enolform des Kreatinins unter anschließender Aromatisierung zu Aminoimidazochinolinen oder -chinoxalinen umsetzen können. In weiteren Untersuchungen konnten Jägerstad et al. diese Hypothese unter anderem durch die Ergebnisse einer Modellumsetzung einer Lösung von Kreatin, Glycin (bzw. Alanin) und Glucose in Wasser/Diethylenglycol bei 130 °C für 2 Stunden stützen [Lit. 136]. Zunächst zeigte eine erhöhte mutagene Aktivität im Ames-Test, dass dabei mutagene Verbindungen entstanden sein mussten. Der Zusatz von 2,5-Dimethylpyrazin und 2-Methylpyridin zu diesen Modellsystemen bewirkte eine weitere Steigerung der mutagenen Aktivität dieser Reaktionslösung. Aus derartig zusammengesetzten erhitzten Modell-Lösungen konnten die Hauptkomponenten MeIQx und 7,8-DiMeIQx isoliert und identifiziert werden. Die Plausibilität des von Jägerstad et al. aufgezeigten Reaktionsweges wurde durch viele weitere Versuche anderer Forschergruppen bestätigt. So konnten Lee et al. [Lit. 155] in einer auf 150 °C erhitzten Mischung aus 2-Methylpyridin, Kreatinin und verschiedenen Aldehyden, gelöst in Diethylenglycol/Wasser, verschiedene HAAs nachweisen. Die Bildungsrate an HAAs stieg in folgender Reihenfolge der eingesetzten Carbonylverbindungen: Acetaldehyd, Acetylformaldehyd und Diacetyl. Der beschriebene Reaktionsweg konnte von Skog et al. [Lit. 155] durch Markierungsexperimente mit komplett  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose bestätigt werden. Durch Verbrennungsanalyse der isolierten HAAs aus dem Markierungsexperiment konnte der Anteil an  $^{14}\text{C}$ -Radionukliden am Gesamt-C bestimmt werden [Lit. 261].

Innerhalb der Gruppe der AIAs kann die Bildung der 2-Aminoimidazo-pyridine, deren häufigster Vertreter das PhIP ist, nicht durch den von Jägerstad et al. vorgeschlagenen Bildungsweg erklärt werden. Vollenbröker [Lit. 307] beschreibt in einem Literaturüberblick im Rahmen seiner Arbeiten eingehend den Wissensstand bezüglich der PhIP-Bildung: intensive Untersuchungen zur Bildung von PhIP zeigten zunächst, dass Phenylalanin und Kreatinin als Vorläufer für die Bildung von PhIP in einem trocken erhitzten Modellsystem ausreichen



[Lit. 57]. Phenylalanin kann durch Leucin, Isoleucin und Tyrosin ersetzt werden [Lit. 117]. Der Zusatz von Glucose hat einen bedeutenden, aber noch ungeklärten Einfluss auf die Bildung von PhIP [Lit. 262]. Nucleinsäuren und verschiedene Aldehyde können laut Manabe et al. [Lit. 170] die Glucose ersetzen.

Im Rahmen seiner Dissertation bezeichnete Nyhammar [Lit. 215] den von Jägerstad postulierten Bildungsweg als vorläufig, da auch eine alternative Bildung – ausgehend von gleichen Ausgangskomponenten (Zucker, Kreatinin, Aminosäure) – denkbar ist. Der Bildungsweg von Nyhammar ist schematisch in Abbildung 1.25 dargestellt.



**Abbildung 1.25**

Vergleich des von Nyhammar vorgeschlagenen Bildungsweges (links) mit dem von Jägerstad et al. postulierten Bildungsweg (rechts)

Nyhammar diskutiert eine erste Kondensation von Kreatinin mit dem Strecker-Aldehyd und anschließend die Reaktion mit den entsprechenden Pyridinen und Pyrazinen (vgl. Kapitel 1.1.1.1). Auch Jones und Weisburger [Lit. 121] greifen dieses Bildungspostulat im Rahmen ihrer Arbeiten über die Inhibierung der Bildung größerer Mengen an HAAs durch Tryptophan und andere Indole in wässrigen Modellsystemen wieder auf.

Da sich beim Erhitzen von Aminosäuren und Monosacchariden eine große Anzahl verschieden substituierter Alkylpyrazine bilden kann, ist davon auszugehen, dass weitere strukturverwandte Imidazochinoxaline entstehen könnten (vgl. dazu Coleman [Lit. 32]). Maga [Lit. 165] gibt einen umfassenden Überblick zum einen über die in verarbeiteten Lebensmitteln vorkommenden, durch die Maillard-Reaktion gebildeten substituierten Pyrazine, und zum anderen über die in verschiedenen Modellansätzen gebildeten Pyrazine.

Zur Bildung von 2-Methylpyridin stellt Nyhammar in seinen Arbeiten verschiedene mögliche Bildungswege dar, räumt aber gleichzeitig ein, dass die anderen zu substituierten Methylpyridinen führenden Bildungsmechanismen noch weitestgehend unbekannt sind.

In den Arbeiten von Mili [Lit. 186] und Pearson [Lit. 222] findet man weitere denkbare, zur Bildung von HAAs aus reduzierenden Zuckern, Aminosäuren und Kreatinin führende Reaktionsmechanismen, die neben den grundlegenden Arbeiten von Jägerstad häufiger in neueren Arbeiten zitiert werden.

Mili, beschreibt sehr allgemeingültig eine zweistufige Bildungstheorie: aus nicht näher beschriebenen radikalischen Strukturen, die sich fortwährend aus der Maillard- und Strecker-Reaktion bilden, entstehen stabile freie Pyridin- und Pyrazin-Radikale, die mit Kreatinin kondensieren können. Die Existenz dieser relativ stabilen radikalischen Intermediate begründet Mili, mit entsprechenden Signalen in ESR-Messungen von erhitzten Diethylenglycolmodell-Lösungen, die neben Kreatinin und Acetaldehyd noch 2,5-Dimethylpyrazin bzw. 2-Methylpyridin enthielten.

Pearson zeigt in seinen Arbeiten zwei verschiedene Bildungswege für HAAs auf (vgl. Abb. 1.26), ohne sie an konkreten Modellsystemen zu belegen. Ein entscheidender Schritt ist dabei eine Retro-Aldolkondensation intermediär gebildeter Amadori-Verbindungen.

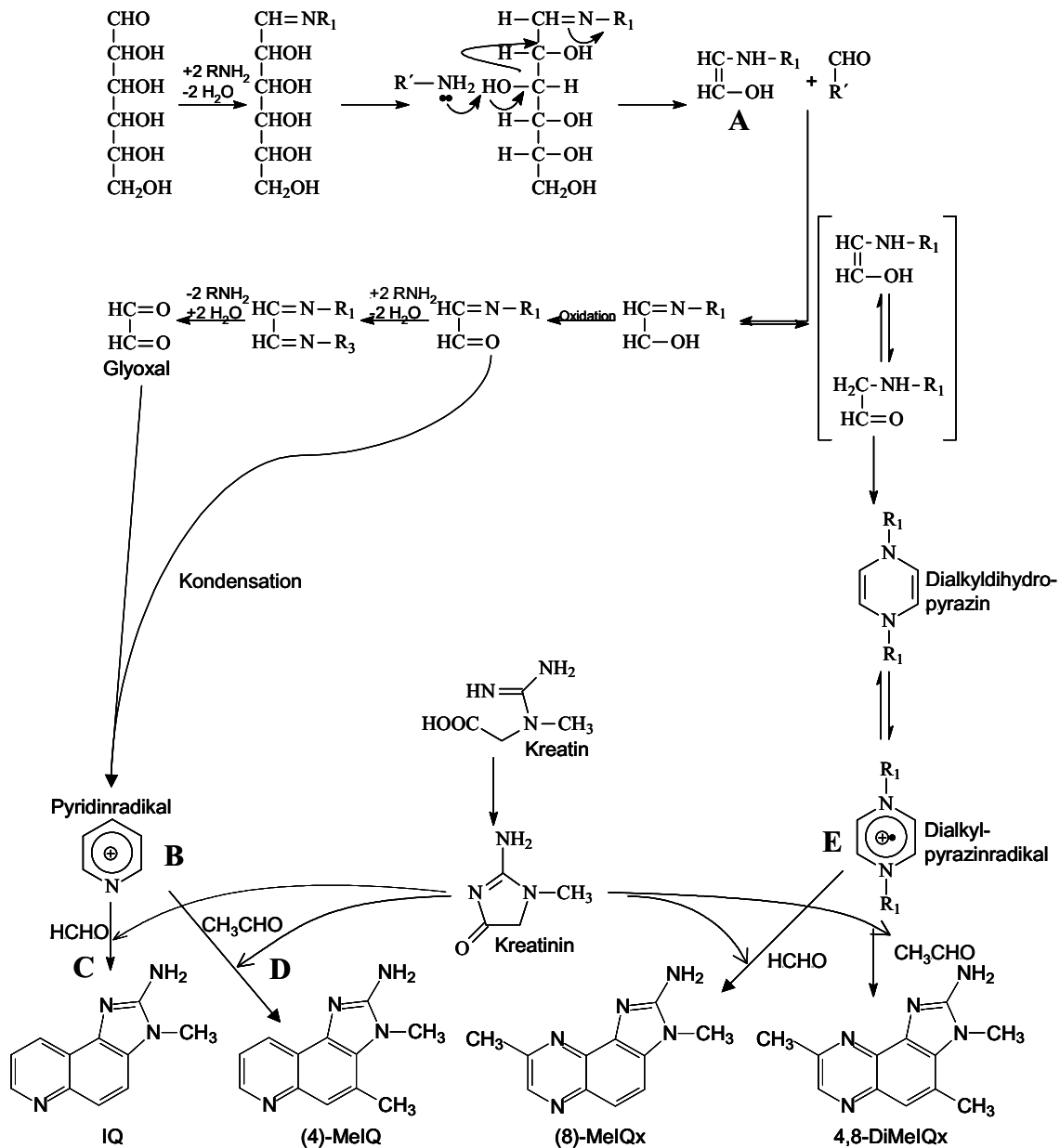


Abbildung 1.26

Vorgeschlagene Bildungswege für IQ, MeIQ, MeIQx und 4,8-DiMeIQx nach Pearson [Lit. 222]

Es entstehen dabei Glycolaldehydalkimine (A), die unter Oxidation und Kondensation mit Glyoxal in einer komplexen Bildungsreaktion zu Pyridin-Radikalen (B) weiter reagieren. Diese Radikale können mit Formaldehyd (C) bzw. Acetaldehyd (D) zu IQ bzw. MeIQ kondensieren. Die Bildung von MeIQx und 4,8-DiMeIQx ist über die Kondensationsreaktion von Dialkylpyrazin-Radikalen (E) mit Formaldehyd bzw. Acetaldehyd denkbar. Radikalische Reaktionsmechanismen konnten in der frühen Phase der Maillard-Reaktion über N,N-Dialkylpyrazinkationradikale bereits durch Namiki et al. [Lit. 203, 204] nachgewiesen werden. Dabei gehen sie davon aus, dass die Radikale vor der Bildung der Amadori-Verbindungen aus den Glykosylaminen gebildet werden (vgl. Abb. 1.7). Die Radikale entstehen in einer komplexen

Kondensationsreaktion zweier Glycolaldehydalkimine unter Reduktion eines Dialkyldihydropyrazins. Über entsprechende Pyridin-Radikale ist noch wenig bekannt.

Vielfach wird in der Literatur angemerkt, dass nur Aminosäure und Kreatinin, nicht aber Zucker für die Bildung von Aminocarbolen und Aminoimidazoazaarenen notwendig sind. Diese Beobachtung stellt die oben beschriebenen Mechanismen in Frage. Allerdings konnten Wang und Odell [Lit. 310] in einfachen Versuchsreihen nachweisen, dass Aminosäuren ohne Zucker bereits verschiedene Pyrazinderivate produzieren können.

#### **1.1.4 Einflussgrößen auf die Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen**

Um die Aufnahme von unerwünschten Stoffen, wie beispielsweise von heterocyclischen aromatischen Aminen, durch die täglich zugeführte Nahrung zu verhindern bzw. möglichst auf ein Minimum zu reduzieren, ist es wichtig, die Einflussgrößen für die HAA-Bildung zu kennen. So können gewonnene Erkenntnisse in die großtechnische Herstellung von Lebensmitteln bzw. deren Zubereitung im privaten Haushalt einfließen. In Modellsystemen, die aus wenigen Komponenten bestehen, wurde und wird deshalb in überschaubarer Matrix nach Einflussgrößen und der Erklärung für ihren Einfluss gesucht. Die wichtigsten Kenngrößen sind die Koch- bzw. Erhitzungstemperatur und -zeit sowie die Erhitzungsart wie Grillen oder Braten und die verschiedenen Zubereitungsformen des Lebensmittels wie z. B. die Zubereitung als Steak oder als Hack bei Fleisch. Da für die Bildung der HAAs Kreatinin, das besonders in Fleisch und Fisch sowie in deren Verarbeitungsformen enthalten ist, ein notwendiger Precursor ist (vgl. Kapitel 1.1.3), sind Untersuchungen an Lebensmitteln zur Klärung der Bildungsparameter in den vergangenen Jahren vornehmlich an Fleisch und Fleischprodukten gemacht worden.

In zahlreichen Abhandlungen wurde die Untersuchung der die HAA-Bildung beeinflussenden Faktoren umfangreich beschrieben (vgl. Skog et al. [Lit. 261]). Zusätzlich sollen Modellsysteme helfen, die Reaktionsabläufe in Lebensmitteln näher zu klären. Je nach Fragestellung werden in Modellsystemen die eingesetzten Zucker und Aminosäuren, der Kreatin/Kreatinin-Gehalt, die Wasseraktivität und die Erhitzungstemperatur und -zeit variiert.

##### **1.1.4.1 Zubereitungstemperatur und Zubereitungszeit**

Der Genusswert von gebratenem Fleisch wird häufig an einer goldgelben Farbe, einem knusprigen Äußeren und einem guten Aroma gemessen. Diese Sinneseindrücke werden vor allem durch Verbindungen, die im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehen, induziert. Für die Er-

zielung eines optimalen Genusswertes sind beim haushaltsüblichen Grillen und Anbraten Temperaturen von 175 °C bis 250 °C für 1 min bis 5 min (je nach Dicke des Fleischstückes) und beim haushaltsüblichen Durchbraten und Backen Temperaturen von 140 °C bis 200 °C für 1 bis 3 Stunden nötig. Bei der Beurteilung der HAA-Bildung in Lebensmitteln sind diese Erhitzungstemperaturen und -zeiten maßgebend.

Knize et al. [Lit. 137] beschreiben in ihren Arbeiten bei Rindfleischstücken einen Anstieg der Gehalte an HAAs mit zunehmender Erhitzungstemperatur. Eine schnelle Zunahme des HAA-Gehaltes ist während der ersten 10 min bis 15 min der Erhitzung zu beobachten (vgl. auch Arvidsson et al. [Lit. 15]). Frühere weniger systematische Untersuchungen an gebratenen Fleischstücken von Skog et al. [Lit. 261] zeigen ebenfalls diese Abhängigkeit. Bei Temperaturen von 150 °C konnten sie mit den damaligen zur Verfügung stehenden Analysemethoden keine bzw. nur geringe Mengen an HAAs im verzehrfertigen Fleischstück nachweisen. Mit höher gewählter Brat-Temperatur (190 ° bzw. 230 °C) stiegen die HAA-Gehalte signifikant an.

Da jede Zubereitungsmethode einen definierten Temperaturbereich bedingt, hat die Art der Zubereitung entscheidenden Einfluss auf die Bildung von HAAs in Lebensmitteln [Lit. 261]. Vernachlässigbare Mengen von HAAs entstehen beim Kochen, Schmoren und Dünsten sowie bei der Erhitzung in der Mikrowelle [Lit. 3], denn hierbei werden die Lebensmittel nur Temperaturen um 100 °C ausgesetzt. Temperaturen über 150 °C werden hingegen beim Braten, Grillen und Frittieren erreicht. Bei diesen Zubereitungsarten entstehen nachweislich die größten Mengen an HAAs aller thermischen Verarbeitungsprozesse von Lebensmitteln (vgl. Felton und Knize [Lit. 57]). Das Grillen stellte dabei bei Erhitzungsversuchen von Sinha et al. [Lit. 254, 255] die am stärksten belastende Zubereitungsmethode bezüglich der Bildung von HAAs und anderen mutagenen Verbindungen dar. Övervik et al. [Lit. 219] stellten fest, dass die Mutagenität in Pfannenrückständen höher ist als in den darin erhitzten Fleischstücken. Die Pfanne ist kontinuierlich hohen Temperaturen ausgesetzt. Die Fleischstücke werden beim Braten öfter gewendet und erreichen meistens, je nach Dicke, nur eine Kerntemperatur von 70 °C. In aus Bratrückständen hergestellten Saucen konnten demnach höhere Gehalte an HAAs bestimmt werden. Schuirmann et al. führten eine Modelltrocknung von Fleischextrakten bei 100 °C durch und konnten bereits bei dieser Temperatur die Bildung größerer Mengen an MeIQx feststellen [Lit. 245]. Bei der Herstellung von Fleischextrakt werden aus Fleisch fett- und proteinfreie wasserlösliche Bestandteile extrahiert und in mehrstufigen Vakuumverdampfern bis auf 80 % Trockenmasse aufkonzentriert.

In allen Untersuchungsreihen scheint die Zeit als technologische Einflussgröße eine untergeordnete Rolle zu spielen. Da auch bei haushaltsüblichen Temperaturen von 170 °C die gebildete Menge an HAAs bereits nach wenigen Minuten ihr Maximum erreicht, ist – unter der Voraussetzung, dass nur wenige Minuten erhitzt wird – der Wärmeübergang als Funktion der Zeit die wichtigste Einflussgröße [Lit. 307]. Bei einer Verdoppelung der Erhitzungszeit ist demnach keine Verdoppelung der Menge an HAAs zu erwarten.

#### 1.1.4.2 Grundzusammensetzung der Lebensmittel

In verschiedenen Modellexperimenten und nachgestellten Bratvorgängen von Fleisch konnte gezeigt werden, dass Kreatinin ein entscheidender Reaktionspartner für die Bildung der HAAs ist (siehe dazu die Übersichtsartikel von Jägerstad et al. [Lit. 115] und Skog [Lit. 268]). Bjeldanes et al. [Lit. 25] erhitzen Lebensmittel, die zwar einen hohen Proteinanteil aufwiesen, aber kein Kreatinin enthielten. In diesen erhitzten Lebensmitteln konnten kaum HAAs nachgewiesen werden. In einem einfachen Versuch besprühten Jägerstad et al. [Lit. 112] Fleischstücke vor dem Braten mit Kreatinin. Die Analyse dieser so behandelten und anschließend gebratenen und homogenisierten Rindfleischstücke ergab höhere Gehalte an HAAs als vergleichbare Proben ohne Kreatininzusatz. In komplexeren Versuchsanordnungen konnte das Ergebnis sowohl für gebratenes Rindfleisch bestätigt werden [Lit. 58, 141] als auch auf die Zubereitung von Fleischerzeugnissen [Lit. 19, 209], auf gegrillte Hähnchen [Lit. 58, 141], gebratenes Schweinefleisch [Lit. 187] sowie auf gegrillte Krabben [Lit. 187] übertragen werden.

Verschiedene Studien befassen sich mit dem Einfluß des Wassergehaltes auf die Entstehung von HAAs in Fleischproben und Modellsystemen. Mit ansteigendem Wassergehalt konnte sowohl in Realproben (Wassergehalte zwischen 30 % und 75 %) als auch in wasserarmen Modellsystemen ( $a_w = 0,44$  bis  $a_w = 0,75$ ) ein Anstieg der HAA-Bildung festgestellt werden (vgl. Eichner und Schuirmann [Lit. 42], Felton et al. [Lit. 54]). In beiden Quellen gehen die Autoren davon aus, dass die HAA-Prekursoren wasserlöslich sind und eine Reaktion der einzelnen Komponenten zu HAAs durch einen höheren Wassergehalt erleichtert wird. Erniedrigt man den Wassergehalt von Fleischstücken vor dem Erhitzen, z. B. durch kurzzeitige Erwärmung in der Mikrowelle [Lit. 54] oder durch wasserbindende Zusätze wie Brotstücke oder Kartoffelstärke [Lit. 268], erfolgt eine geringere Bildung von HAAs.

Zucker haben einen ambivalenten Einfluss auf die Menge der gebildeten HAAs. Das für eine maximale Ausbeute optimale molare Verhältnis der für die HAA-Bildung nach der „Las Vegas Hypothese“ (vgl. Kapitel 1.1.3) notwendigen Komponenten reduzierender Zucker, Kreatinin und Aminosäure liegt in Fleisch etwa bei 1:2:2. Bei diesem molaren Verhältnis erhielt Skog [Lit. 268] in Lebensmitteln nachgestellten Modellsystemen die höchsten Ausbeuten an Aminoimidazoazaarenen. Verschiedene Kohlenhydrate zeigten in wässrigen Modellsystemen einen fördernden Einfluss auf die HAA-Bildung (vgl. Skog und Jägerstad [Lit. 262]). Bei erhitztem Fleisch konnte jedoch die mutagene Aktivität durch Zusatz von Glucose oder Lactose – in reiner Form oder als Milchpulver – erniedrigt werden [Lit. 258]. Es ist zu vermuten, dass dieser mindernde Effekt im Zusammenhang mit der zur HAA-Bildung konkurrierenden Bildung von anderen Maillardprodukten steht, die bei einem Überschuss an Zucker bevorzugt entstehen [Lit. 307]. Diese Vermutung wird gestützt durch die Arbeiten von Köhler und Odell [Lit. 143]. Sie zeigten, dass ein Überschuss an Glucose in Modellsystemen die Bildung von Methyl- und Dimethylpyrazinen, die entscheidend die HAA-Bildung beeinflussen, verringert.

Bei der Untersuchung des Einflusses von Zuckern auf die HAA-Bildung in Lebensmitteln sind verschiedene Gesichtspunkte zu berücksichtigen. Der Gehalt an Zuckern und Zuckerabbauprodukten, welche im Rahmen der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln entstehen, die zusätzlich noch große Mengen an Kreatinin und freien Aminosäuren enthalten und somit für die HAA-Bildung prädestiniert sind, schwankt je nach Provenienz und Art der Verarbeitung und Herstellung. Zu beachten ist hierbei insbesondere die Freisetzung von Zuckern beim Schlachtprozess sowie der Abbau von Zuckern bei vorgeschalteten Reifungen.

Klare Aussagen über den Einfluss von Zuckern aus Versuchsreihen mit verschiedenen Lebensmitteln können daher aufgrund der schwankenden Zusammensetzung hinsichtlich der Art und Menge an Zuckern nicht getroffen werden. Daher ist es angebracht, die Zusammensetzung der zu untersuchenden Lebensmittel in Modellsystemen nachzustellen, dabei aber genau festgelegte Mengen der Reaktionspartner zuzugeben. Die Erkenntnisse aus Modellsystemen mit Zuckern und Zuckerabbauprodukten werden im Rahmen der Ergebnisse der eigenen Arbeiten präsentiert.

Bereits Jägerstad et al. [Lit. 112] konnten in Modellansätzen zeigen, dass freie Aminosäuren, aber nicht Oligo- oder Polypeptide essentielle Komponenten bei der Bildung der HAAs sind. In nahezu allen wässrigen Reaktionsansätzen von Kreatinin und Glucose mit verschiedenen Aminosäuren (ein Zusatz von Diethylenglycol ermöglichte eine Erhitzungstemperatur von 128 °C am Rückfluss) konnten sie mit dem Ames-Test eine mehr oder weniger starke muta-

gene Aktivität nachweisen. Threonin erzeugte die höchste mutagene Aktivität, gefolgt von Glycin und Lysin. Johannsson et al. [Lit. 117] konnten in wässrigen Kreatinin-Glucose-Aminosäure-Modellsystemen gebildete HAAs nachweisen und bestimmen (Erhitzung in druckfesten Gefäßen ermöglichte Reaktionstemperaturen bis zu 180 °C). Die höchsten Mengen an MeIQx, die oft als Marker für die Gesamtmenge der gebildeten HAAs angesehen werden, waren ebenfalls bei der Verwendung der Aminosäure Threonin festzustellen, gefolgt von Lysin, Alanin, Tryptophan, Valin und Glycin. Geringste Mengen an HAAs konnten beim Einsatz von Prolin und Cystein bestimmt werden. Vergleichbare Untersuchungsreihen mit Diethylenglycol/Wasser-Modellsystemen konnten die Abstufung in der Reaktivität der einzelnen Aminosäuren bestätigen. Die Variation der Aminosäuren in vergleichbaren Modellsystemen führt neben der immer beobachteten Bildung von MeIQx auch zur Bildung weiterer HAAs je nach eingesetzter Aminosäure [Lit. 261]. Aminosäuren sind als notwendige Voraussetzung für die HAA-Bildung anzusehen, da sie die Stickstoffquelle bei der Bildung der Pyrazine darstellen [Lit. 144]. Die Ausbeute und die Art der gebildeten Pyrazine wird von den an der Reaktion beteiligten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen sowie von den vorliegenden Aminosäuren bestimmt (vgl. Piloty und Baltes, [Lit. 225]; Köhler et al., [Lit. 143, 144]; Arnoldi et al., [Lit. 13]). Die Beteiligung freier Aminosäuren an der Bildung von mutagenen Verbindungen in Fleisch konnte von Övervik et al. [Lit. 219] auch im Lebensmittel Fleisch gezeigt werden. Die Zugabe verschiedener Aminosäuren zu Schweinefleischschnitzel vor dem Anbraten bewirkte einen Anstieg der mutagenen Aktivität der homogenisierten verzehrsfertigen Schnitzel im Ames-Test. Bei einem Fleischextrakt, der vor der letzten Trocknungs- bzw. Eindickstufe einer enzymatischen Proteolyse unterzogen wurde, konnten Taylor et al. [Lit. 285] eine erhöhte mutagene Aktivität feststellen. Wird die während des Bratens von frischem Schweinefleisch auslaufende Flüssigkeit mit Aminosäuren, speziell mit Glutamin, Tyrosin, Threonin und Alanin, angereichert und weiter erhitzt, so steigt die Menge der gebildeten HAAs (vgl. Lee et al. [Lit. 155]).

#### **1.1.4.3 Weitere die Bildung von HAAs beeinflussende Faktoren**

Der Einfluss des Fettgehaltes von Fleisch konnte bisher nicht genau geklärt werden. Vollenbröker [Lit. 307] unterscheidet in seinen Arbeiten zwischen physikalischen und chemischen Effekten. Umfangreiche Ausführungen dazu findet man in den Arbeiten von Johannsson [Lit. 120]. Als rein physikalischer Effekt ist neben der stärkeren Verdünnung durch einen höheren Fettgehalt der bessere Wärmeübergang von Fett zu Wasser beschrieben. Diese beiden



zu beobachten Effekte werden als gegenläufig diskutiert, d. h. Fett kann die HAA-Bildung sowohl verringern als auch erhöhen. So kann durch eine schnellere Hitzeeinwirkung die Bildung der HAAs gefördert werden.

Während der frühen Phase der Maillard-Reaktion werden u. a. Reaktionswege über Radikalkationen hin zu Folgeprodukten wie Amadori-Verbindungen und  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen angenommen [Lit. 203]. Ein Einfluss von freien Radikalen, die während der thermisch induzierten Fettoxidation gebildet werden, auf die Bildung von HAAs ist nicht auszuschließen. Johansson [Lit. 203] konnte eine deutliche Beeinflussung der HAA-Bildung in Abhängigkeit von den eingesetzten Fettarten feststellen. Ihre Untersuchungen führten dazu, dass neben dem Einfluss des Oxidationsgrades auch die Fettsäurezusammensetzung des zugesetzten Fettes als mögliche Einflussgröße diskutiert wird.

Des Weiteren üben Metallionen, freie Radikale und Antioxidantien einen Einfluss auf die HAA-Bildung aus [Lit. 119]. Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ) fördern als bekannte Katalysatoren der Fettoxidation die Bildung von IQx, MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx in Modellsystemen. Ein Einfluss von Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) konnte jedoch nicht beobachtet werden. Johansson et al. [Lit. 119] konnten an Modellsystemen zeigen, dass ein Einsatz von Antioxidantien wie BHA, BHT, Propylgallat und Tocopherolen unterschiedlicher Provenienz die Bildung von MeIQx in Bezug auf ein Vergleichsmodell ohne Antioxidantien fördert.

### **1.1.5 Einfluss von Abbauprodukten der frühen Phase der Maillardreaktion auf die Bildungsrate von HAAs**

Schuirman [Lit. 246] konnte in Kreatinin enthaltenden wasserarmen Modellsystemen auf der Basis von mikrokristalliner Cellulose durch einen teilweisen Ersatz von Fructose und Glycin durch Vorstufen der Maillard-Reaktion, z. B. 2-Amino-2-desoxyaldosen (Heyns-Umlagerungs-Produkte), aber auch durch Zusatz reaktiver Maillard-Abbauprodukte aus pflanzlichen Rohstoffen, z. B. aus Tomatenmarkkonzentraten, eine verstärkte Bildung von MeIQx beobachten. Er schließt daraus, dass Maillard-Reaktionsprodukte effektiv wirksame Vorstufen für die Bildung von HAAs darstellen, wenn auch durch andere Untersuchungen [Lit. 219, 284, 330] belegt wurde, dass auch ohne den Einsatz von Zuckern mutagene Verbindungen in erheblichen Umfang gebildet werden können. Die Förderung der mutagenen Aktivität in Fleisch und Fleischprodukten durch einen mäßigen Zusatz von Zuckern wird in vielen Arbeiten hypothetisch über die beschleunigte Bildung von Intermediaten wie Pyrazinen, Pyridinen und Streckeraldehyden erklärt [Lit. 115, 310]. Nur wenige Arbeiten setzen derartige Intermediate in

Modellsystemen ein. In Modellsystemen von Lee und Lin [Lit. 156] wurden sechs ausgewählte Intermediate der Maillard-Reaktion dem Bratensaft von leicht angebratenem Schweinefleisch zugegeben. Es zeigte sich, dass der Zusatz von Tetrahydrothiophen, gefolgt von 2,3-Dimethylpyrazin, 3-Methylpyridin und 2-Methylpyridin eine im Ames-Test erkennbare Steigerung der mutagenen Aktivität bewirkt. Der Zusatz von 2-Acetylpyrrol und -imidazol reduzierte die mutagene Aktivität beträchtlich. Yen et al. [Lit. 328] stellten eine Unterdrückung der Bildung von MeIQx in erhitzten Kreatinin, Glycin und Glucose enthaltenden Modellsystemen durch Xylose-Lysin-Maillard-Reaktionsprodukte (MRP) fest. Bei diesen MRPs handelt es sich um eine Mischung aus Intermediaten, Bräunungsprekursoren sowie nieder- und hochmolekularen Bräunungsprodukten, die entstehen, wenn Zucker und Aminosäuren in wässriger gepufferter Lösung ausreichend miteinander erhitzt werden. Eine eindeutige Schlussfolgerung kann man aus diesem Modellansatz nicht ziehen. Vollenbröker [Lit. 307] stellt in seinen Arbeiten einen bisher noch nicht beschriebenen Einfluss von Pentosen auf die Bildung von MeIQx in nach industriellen Vorgaben im Labor hergestellten Reaktionsaromen des Maillard-Typs dar. Dabei wurden Fleischextrakt und Xylose unter von der Industrie vorgegebenen technologischen Parametern (Wassergehalt, Temperaturführung) zur Reaktion gebracht. Ein Xylose-Zusatz von 0,2 g pro g Fleischextrakt unterdrückte die MeIQx-Bildung fast gänzlich. Von Skog [Lit. 257] wurde erst für einen Glucose-Zusatz von 1000 mg pro g Fleischextrakt eine die HAA-Bildung unterdrückende Wirkung beschrieben. Eine Erklärung für die Wirkung von Xylose konnte Vollenbröker nicht geben. Es ist jedoch aufgrund der im Allgemeinen größeren Reaktivität von Pentosen im Rahmen der Maillard-Reaktion zu vermuten, dass diese die HAA-Bildung in stärkerem Maße beeinflussen können. Abbauprodukte der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Xylose können mit Bestandteilen des Fleischextraktes reagieren und so dessen Zusammensetzung verändern. Aus einer geänderten Zusammensetzung resultiert auch ein geändertes Bildungsverhalten von Folgeprodukten wie den HAAs. Pentosen sind in Fleisch und Fleischprodukten in größerer Menge enthalten als in anderen Lebensmitteln. In solchen Produkten haben daher die Pentosen eine wichtige Bedeutung bei Maillard-Prozessen. Da der Verlauf der Maillard-Reaktion maßgeblich die Bildung der heterocyclischen aromatischen Amine beeinflusst, ist es notwendig zu klären, inwieweit Pentosen und Pentoseabbauprodukte die Art und Menge der gebildeten HAAs beeinflussen.

## 1.2 Problemstellung und Zielsetzung

Bereits im Jahr 1977 wurden bei der Suche nach einem möglichen Zusammenhang zwischen Nahrungsaufnahme und Krebsentstehung die ersten Vertreter der stark mutagenen Stoffklasse der heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs) entdeckt. HAAs sind sowohl in Fleisch und fleischhaltigen als auch in nicht-fleischhaltigen Lebensmitteln (PhIP in Bier, MeA $\alpha$ C in Sojasaucen) identifiziert worden. Ihre Bildung erfolgt im Rahmen der Maillard-Reaktion. Dabei reagieren Kreatin bzw. Kreatinin und Folgeprodukte der Maillard-Reaktion wie Pyrazine, Pyridine und Aldehyde zu Aminoimidazo-chinolenen, -chinoxalinen und -pyridinen.

Die DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM) stellte im Jahr 1998 im Unterschied zu früheren Schätzungen, die eine tägliche Aufnahme bis zu 100  $\mu$ g HAAs pro Person und Tag angenommen hatten, fest, dass die tägliche Aufnahmemenge mit der Nahrung in der Regel etwa 1  $\mu$ g pro Person und Tag nicht überschreitet. Das mit der HAA-Aufnahme verbundene Krebsrisiko des Menschen sollte damit deutlich geringer sein als ursprünglich von vielen Forschergruppen angenommen. Eine genauere Abschätzung dieses Risikos wurde erst durch moderne analytische Verfahren ermöglicht. Umfangreiche Untersuchungsreihen an Lebensmitteln unterschiedlicher Art und Provenienz ermöglichten es, einen konkreten Statusbericht über die Belastung der aufgenommenen Nahrung mit HAAs abzugeben. Die zu den HAAs führenden Bildungswege unter Beteiligung der Maillard-Reaktion sind jedoch in ihrer Gesamtheit weit weniger bekannt.

So können Modellsysteme durch gezielte Auswahl der Reaktionspartner überschaubarer gestaltet und deren individuelles Reaktionsverhalten, insbesondere unter der Wirkung wechselnder technologischer Einflussgrößen, genauer untersucht werden.

Im Hinblick auf die Bildung von HAAs spielt die Maillard-Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und Aminosäuren unter Einbeziehung von Kreatinin – einem Inhaltsstoff von Fleisch und Fleischprodukten – die Hauptrolle. Diese Komponenten sollen deshalb als Bestandteile von Modellsystemen eingesetzt werden. Ein wichtiges Ziel dabei ist, den zur Bildung von HAAs führenden Verlauf der Maillard-Reaktion unter verschiedenen Reaktionsbedingungen zu verfolgen. Unter diesem Gesichtspunkt soll zudem versucht werden, anstelle von reduzierenden Zuckern und Aminosäuren Amadori-Verbindungen als Zwischenstufen der Maillard-Reaktion in die Modellsysteme zu integrieren, da bei ihrem Abbau sehr reaktive Dicarbonylverbindungen gebildet werden. Diese reagieren mit Aminosäuren zu „Strecker-Aldehyden“ und Pyrazinen, die wichtige Vorläufer der HAA-Bildung darstellen.

Ausgehend von der Beobachtung von Vollenbröcker, dass zunehmende Mengen an Xylose im niedrigen Konzentrationsbereich die HAA-Bildung fördern, bei höheren Konzentrationen

aber hemmende Wirkung ausüben, soll in den eigenen Untersuchungen auch Xylose als reduzierender Zucker eingesetzt werden, um die Hintergründe dieses ambivalenten Verhaltens zu beleuchten. Daher soll insbesondere untersucht werden, inwieweit reaktive, Dicarbonylstrukturen aufweisende Abbauprodukte der Xylose bzw. der daraus gebildeten Amadori-Verbindungen die HAA-Bildungen beschleunigen.

Um Aussagen über die Bildungsraten dieser sehr reaktiven Verbindungen treffen zu können, soll die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin ausgenutzt werden. Mit dieser ist es möglich, die Dicarbonylverbindungen in Form ihrer stabilen Chinoxalinderivate abzufangen und quantitativ zu bestimmen.

Zwar lassen sich die HAAs relativ leicht durch saure oder alkalische Extraktion aus den Lebensmitteln isolieren, jedoch bereitet die meist komplex zusammengesetzte Matrix erhebliche Probleme bei der Analyse. Oft sind die Vergleichbarkeit und die Reproduzierbarkeit sowie die Wiederfindungsraten von dotierten Proben stark matrixabhängig, sodass keine präzisen Aussagen über die vorhandenen Mengen an HAAs gemacht werden können. Ihre Bestimmung ohne umfangreiche Aufreinigung ist nicht möglich. Ein weiterer Schwerpunkt soll daher auf der Entwicklung reproduzierbar durchführbarer, routinetauglicher Isolierungs- und Aufarbeitungsmethoden liegen, um eine Vielzahl von Proben zeitnah bearbeiten zu können.

Die HPLC an Umkehrphasen mit anschließender massenselektiver Detektion (HPLC-ESI-MS/MS) hat sich als Bestimmungsmethode der Wahl etabliert. Die Bestimmung der HAAs soll daher unter Ausnutzung der stetigen technischen Verbesserungen der auf dem Markt befindlichen ESI-Massenspektrometer dahingehend optimiert werden, dass diese Detektionsmethode als zuverlässige Alternative zu der bis heute noch weit verbreiteten Diodenarray-Detektion angewandt werden kann.

Um die Ergebnisse aus den eigenen Modellsystemen abzusichern, ist es wichtig, bei der Bestimmung der HAAs auf mindestens zwei physikalisch unterschiedliche Trennmethoden zurückzugreifen. Schuirmann und Vollenbröcker beschreiben in ihren Arbeiten einen gaschromatographischen Nachweis von HAAs nach entsprechender Acetylierung bzw. Silylierung. Trotz umfangreicher Methodenentwicklung gelang es ihnen jedoch nicht, eine routinetaugliche GC-MS-Methode zu entwickeln.

In der Literatur werden weitere mögliche Derivatisierungsschritte beschrieben. Lediglich die Derivatisierung mit 3,5-bis-Trifluor-methylbenzylbromid wurde häufiger angewandt und bei der Analytik von Realproben eingesetzt. Da den Derivatisierungen eine Aufreinigung mit mehreren Flüssig/Flüssig-Verteilschritten, Variation des pH-Wertes und Wechsel des Lösungsmittels folgen muss, ist der Einsatz in der Routineanalytik schwer möglich.

Ausgehend von guten Erfahrungen im hiesigen Institut für Lebensmittelchemie mit der gaschromatographischen Bestimmung von Aminosäuren in Form ihrer entsprechenden tert.-Butyldimethylsilylderivate soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, heterocyclische aromatische Amine ebenfalls als tert.-Butyldimethylsilylderivate mittels GC-MS zu bestimmen. Die entsprechenden Derivatisierungsparameter wie die Auswahl geeigneter Lösungsmittel und Derivatisierungsreagenzien sowie geeigneter Derivatisierungsbedingungen müssen unter der Vorgabe der Routinetauglichkeit dahingehend optimiert werden, dass eine GC-MS-Bestimmung der HAAs ohne weitere Aufreinigung der Silylierungsansätze möglich ist.

Mithilfe einer ausreichend präzisen GC-MS-Trennmethode sollen Markierungsexperimente (Labellingexperimente) mit  $^{13}\text{C}$ -markierten Kohlenhydraten durchgeführt werden. Unter Ausnutzung geeigneter Markierungstechniken soll der Einbau bestimmter, aus den eingesetzten Kohlenhydraten stammender Kohlenstoffatome in die jeweiligen gebildeten HAAs untersucht werden. So kann mit dieser Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung weiterer noch unbekannter Bildungsmechanismen geleistet werden.

## 2 Untersuchungen zur Analytik von heterocyclischen aromatischen Amin

### 2.1 Überblick über verschiedene gängige Aufarbeitungsschritte

#### 2.1.1 Notwendigkeit einer Isolierung und Aufreinigung

Mutagene heterocyclische aromatische Amine (HAAs) treten in Lebensmitteln nur im ng/g-Bereich auf (vgl. Kapitel 1.1.2). Daher ist es erforderlich, den Analysengang auf eine empfindliche und selektive Bestimmung der HAAs auszurichten. Die im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten Hauptkomponenten liegen oft im tausendfachen Überschuss vor und müssen abgetrennt werden. In vielen Matrices, besonders aber in Reaktionsaromen des Maillard-Typs, liegen chemisch ähnliche Verbindungen vor, die durch eine unselektive Aufreinigung nicht abgetrennt werden können und später die Chromatographie und die Detektion erheblich stören. Um für die Analyse diese störenden Verbindungen zu entfernen und gleichzeitig die HAAs aus der üblicherweise komplex zusammengesetzten Lebensmittelmatrix zu isolieren, muss man dem (eigentlichen) qualitativen Nachweis und der quantitativen Bestimmung der HAAs mehrstufige Reinigungsschritte (clean up) vorschalten. Im Laufe der Zeit wurden viele unterschiedliche Kombinationsvarianten von Reinigungsschritten publiziert. Die große Zahl an Review-Artikeln (vgl. Kataoka et al. (1997, [Lit. 124]); Toribio (2000, [Lit. 294]); Skog (2002, [Lit. 269])) macht dies deutlich. Der Analysengang wird in diesen Artikeln häufig in Extraktions-, Isolierungs- und Aufreinigungsschritte unterteilt. Ein vorgeschalteter Schritt ist die Homogenisierung der oft komplex zusammengesetzten heterogenen Lebensmittelmatrix durch geeignete Techniken wie das Vermahlen mit flüssigem Stickstoff eingefrorener Analysenproben (Kryo-Vermahlung) oder das Homogenisieren von Lösungen mit entsprechenden Mixern (z. B. mit dem Ultra-Turrax<sup>®</sup>).

#### 2.1.2 Mögliche Extraktionsverfahren

Zur Extraktion der HAAs werden die homogenisierten Proben zunächst in einem geeigneten Lösungsmittel suspendiert. Da die meisten HAAs eine aromatische Struktur aufweisen und eine exocyclische Aminogruppe besitzen, sind sie als Basen besonders gut in polaren Lösungsmitteln zu solvatisieren. Eine Arbeit von Uyeta et al. [Lit. 302] vergleicht die Extraktion von mutagenen Verbindungen des HAA-Typs aus 50 verschiedenen Lebensmitteln mit unterschiedlichen Lösungsmitteln. Dabei stieg die Ausbeute mit steigender Polarität des Lösungs-

mittels an. Somit können polare organische Lösungsmittel wie Methanol [Lit. 17, 39, 122, 157], Aceton [Lit. 162, 291], Dichlormethan [Lit. 78, 296], n-Butanol [Lit. 72, 214] oder Ethylacetat [Lit. 188] eingesetzt werden. Eine Suspendierung der Probe kann auch im wässrigen Milieu erfolgen. So wurde in den vergangenen Jahren häufig Salzsäure [Lit. 168, 197, 230, 290, 305, 306] mit unterschiedlicher Normalität eingesetzt. Seit den vergangenen Jahren wird für die erste Extraktionsstufe zunehmend 1 N Natronlauge verwendet, um eine direkte Flüssig-Flüssig-Extraktion mit einem wasserunlöslichen, organischen Lösungsmittel anschließen zu können [Lit. 75]. Auch eine gelinde Erwärmung wird in einigen Publikationen vorgeschlagen [Lit. 223, 267]. In allen Fällen folgt ein Filtrations- oder Zentrifugationsschritt.

### **2.1.3 Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Verteilschritte**

Für den analytischen Nachweis und die Identifizierung mutagener und carcinogener heterocyclischer Amine aus Extrakten, die durch geeignete Extraktionsmittelwahl aus Lebensmitteln und Modellsystemen gewonnen wurden, ist die Anwendung geeigneter Isolierungs- und Aufreinigungsmethoden Voraussetzung.

Zur Isolierung der Analyten sind Flüssig-Flüssig-Verteilschritte das Mittel der Wahl. Die Verteilungen finden dabei zwischen einer wässrigen Phase mit definiertem pH-Wert und einer damit nicht-mischbaren organischen Lösungsmittelphase statt. Durch geeignete Wahl des pH-Werts kann der NERST'sche Verteilungskoeffizient dahingehend beeinflusst werden, dass die Analyten quantitativ aus dem Extrakt isoliert werden können (vgl. Kapitel 2.1.3.1).

Die wässrige Phase kann bei den Verteilungsschritten auch an Festphasen immobilisiert werden (vgl. Kapitel 2.1.3.2).

#### **2.1.3.1 Flüssig-Flüssig-Verteilung mit verschiedenen Lösungsmitteln**

Damit die HAAs nach alkalischer Extraktion durch eine Flüssig-Flüssig-Verteilung weiter aufgereinigt werden können, müssen sie nach Homogenisierung des Extraktes, nach Entfernung möglicher fester Bestandteile und – wenn nötig – nach Entfernen des Lösungsmittels durch Aufnehmen des Rückstandes in verdünnter Salz- oder Phosphorsäure in die protonierte Form überführt werden. Die saure Lösung kann dann direkt mit Dichlormethan [Lit. 157, 162, 230, 290], Diethylether [Lit. 122], Chloroform [Lit. 145] oder Ethylacetat ausgeschüttelt werden, um saure oder neutrale Störsubstanzen zu entfernen. Bei höherem Fettgehalt der Probe können so auch durch mehrmaliges Ausschütteln die Lipide entfernt werden. Werden dann die gereinigten Extrakte alkalisiert, können die Analyten in ihrer neutralen Form mit

Dichlormethan oder anderen geeigneten Lösungsmitteln ausgeschüttelt werden. Sofern die Extrakte genügend sauber sind, kann der Reinigungsschritt im Säuren häufig entfallen und direkt alkalisiert werden.

### 2.1.3.2 Isolierung durch Flüssig-Flüssig-Verteilung an Festphasen

Eine Flüssig-Flüssig-Verteilung kann auch an Diatomeenerden, ein sandartiges poröses Material, das käuflich als Kieselgur, Extrelut NT<sup>®</sup> oder Hydromatrix zu erwerben ist, erfolgen. Dabei saugen sich die Poren des Materials gleichsam wie ein Schwamm mit wässriger Extraktlösung voll. Beim Versetzen mit Dichlormethan findet eine Flüssig-Flüssig-Verteilung an der Oberfläche der Poren statt, ohne dass die Gefahr einer Emulsionsbildung besteht. Eine derartige Flüssig-Flüssig-Verteilung an porösem Trägermaterial wurden besonders von Gross und Grüter [Lit. 75] getestet und zur Standardmethode weiterentwickelt. Der Name „Tandem-Festphasenextraktion“ beruht auf dem Hintereinanderschalten einer Kartusche mit Diatomeenerden mit einer weiteren Kartusche, gefüllt mit einem an einer Festphase gebundenen Ionenaustauscher. Im konkreten Fall schalteten Gross und Grüter hinter einer mit Kieselgur oder Extrelut NT<sup>®</sup> gefüllten Kartusche eine Propylsulfonsäure-SPE-Kartusche, eine Kieselgelfestphase mit kovalent gebundenen Sulfonsäuregruppen, die als Kationenaustauscher wirken. Dabei wurden die an das Kieselgur gebundenen HAAs mit Dichlormethan auf den direkt nachgeschalteten Kationenaustauscher gespült. Von dieser konnten Gross und Grüter die HAAs in zwei Fraktionen eluieren. Mit einem Salzsäure/Methanol-Eluenten können die apolaren HAAs, zu denen die Aminocarboline, Harman und Norharman gezählt werden, eluiert werden. Die Elution der polaren HAAs (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, PhIP) kann mit einer Ammoniumacetat-Lösung erfolgen. Zur weiteren Aufreinigung empfehlen Gross und Grüter einen zusätzlichen Reinigungsschritt an einer C<sub>18</sub>-Festphase (siehe Kapitel 2.1.6).

Die Adsorption an sogenanntes „Blue Cotton“ oder „Blue Rayon“ ermöglicht ebenfalls eine wirksame Reinigung der im ersten Schritt gewonnenen Extrakte. Blue-cotton ist eine mit dem blauen Farbstoff Trisulfokupfer-phthalocyanin benetzte Baumwolle. Dieses Adsorptionsmaterial wurde von Hayatsu et al. [Lit. 86] speziell für Moleküle mit planarer polyzyklischer Molekülstruktur wie die HAAs entwickelt. In seinen Arbeiten konnte Hayatsu zeigen, dass mit diesem Material eine selektive und quantitative Isolierung der HAAs aus den Extrakten möglich ist. Eine weitere Extraktion unter Einsatz von Kupferphthalocyanin wurde auch von Gross [Lit. 77] vorgestellt. In diesem Fall wurde der Farbstoff jedoch an Sephasorb<sup>®</sup> als



Trägermaterial gebunden und – wie oben bereits beschrieben – als zweite Kartusche bei einer Tandem-Festphasenextraktion verwendet.

Die durch Flüssig-Flüssig-Extraktion oder durch Tandemfestphasenextraktion gewonnenen Isolate enthalten neben den HAAs noch zahlreiche Störkomponenten in geringer Konzentration. Ohne Entfernung dieser Störkomponenten ergibt sich bei der nachfolgenden Bestimmung mittels HPLC oder GC am jeweiligen Detektor ein starkes chemisches Rauschen, woraus eine erhöhte Nachweisgrenze resultiert. Zur weiteren Reinigung werden daher in der Literatur zahlreiche chromatographische Methoden an unterschiedlichen Materialien beschrieben. Zum Teil wurden sie als alleinige Extraktaufreinigungsschritte konzipiert, was jedoch zu keinen akzeptablen Ergebnissen führte.

#### **2.1.4 Reinigung gewonnener Isolate durch Säulenchromatographie und semipräparative HPLC**

Aufgrund ihrer chemischen Struktur können HAAs mit Ionenaustauscherharzen weiter aufgereinigt werden [Lit. 74]. Eine akzeptable Reinigung von Isolaten an XAD-2-Harzen wird von Krach et al. beschrieben [Lit. 145]. Kato et al. [Lit. 128] benutzten zur Reinigung von Lebensmittelproben bzw. Aufreinigung von Isolaten die Gelchromatographie an Sephadex LH-20. Für die unpolaren  $\alpha$ - und  $\beta$ -Carboline sowie für PhIP wurde auch die Aufarbeitung mittels Kieselgel beschrieben (Manabe et al. [Lit. 169]). Der Einsatz von Carboxymethylcellulose als Säulenmaterial wurde zwar beschrieben [Lit. 85], eine praktikable Anwendung hat sich jedoch nicht durchgesetzt.

Schuirmann [Lit. 246] nutzte die semipräparative HPLC an einem Polysulfonsäure-Kationenaustauscher, um einen höheren Probendurchsatz bei leichterer Automatisierbarkeit bei der Reinigung der Isolate gewährleisten zu können. Während er mit dieser Methode eine ausreichend gute Aufreinigung von Fleischextrakten und Modellansätzen erreichen konnte, gelang es Nutt [Lit. 213] nicht, mit derselben Methode eine akzeptable Reinigung von Isolaten aus Reaktionsaromen zu erreichen. Das wesentliche Problem neben der nicht genügenden Aufreinigung war laut Nutt das unterschiedliche chemische Verhalten der HAAs in Anwesenheit und Abwesenheit von hocherhitzten Matrixbestandteilen wie hochpolymeren Bräunungsprodukten. Diesen Effekt konnte sie bereits an mit Standardsubstanzen dotierten Matrixproben feststellen. Sie postulierte ionische Komplexe zwischen den HAAs und der entsprechenden Matrix, die sie durch starkes Ansäuern und die Verwendung einer zusätzlichen Anionenaustauscherkartusche brechen konnte.

Neben den Kationenaustauscher-Materialien wurden noch Umkehrphasen (C<sub>18</sub>-Material) und Cyanophasen verwendet.

Das im Vergleich zu den vorgestellten Methoden eleganteste Aufreinigungsverfahren ist die von Turesky et al. [Lit. 299] bereits im Jahr 1989 entwickelte Immunoaffinitätschromatographie unter Verwendung monoklonarer Antikörper für MeIQx. Der Vorteil dieser Methode ist die ausschließlich bei Einhaltung bestimmter Reaktionsbedingungen reversible Bindung von MeIQx an die mit monoklonalen Antikörpern belegte Phase. Nicht für alle HAAs sind jedoch monoklonale Antikörper aus Tierversuchen zugänglich.

### 2.1.5 Reinigung gewonnener Isolate durch Festphasenextraktion (SPE)

Säulenchromatographie an Ionenaustauscherharzen sowie semipräparative HPLC wurden als Reinigungsstufe der Wahl seit Mitte der Achtzigerjahre bis zum Anfang der Neunzigerjahre eingesetzt, um die Analyten vom Matrixüberschuss, der die nachgeschaltete chromatographische Trennung stört, zu trennen. Die Säulenchromatographie an Ionenaustauscherharzen orientierte sich maßgeblich an den Arbeiten von Hayatsu et al. [Lit. 85] aus dem Jahre 1983. Nachfolgende Arbeiten unter Nutzung der semipräparativen HPLC an Kationenaustauscherphasen orientierten sich an der von Takahashi et al. im Jahr 1985 publizierten Methode [Lit. 281]. Heute wird eine weitere Aufreinigung der Isolate an Kartuschen, die mit verschiedenen an Kieselgel oder ähnlichen Materialien immobilisierten Festphasen (solid phase extraction, SPE) gefüllt sind, durchgeführt. Mithilfe immer besserer Trenn- und Detektionsmethoden erreicht man immer niedrigere Nachweisgrenzen. Somit können geringere Probenmengen gewählt werden. Der Analysengang ermöglicht gegenüber der Säulenchromatographie einen Zeitgewinn und ein Einsparpotential an Lösungsmitteln. Außerdem eignet sich diese Aufreinigung zur Automatisierung. Im Rahmen seiner Arbeiten zur Entwicklung einer Trennmethode für HAAs testete Vollenbröker [Lit. 307] zahlreiche SPE-Materialien hinsichtlich ihrer Trenn- und Aufreinigungsleistung.

Eine der HPLC-Trennung vorgeschaltete kombinierte Aufreinigung an Benzylpropylsulfonsäure-Kartuschen (SCX-SPE) und an Umkehrphasenkartuschen (C<sub>18</sub>-SPE) hat sich bewährt (vgl. Vollenbröker [Lit. 307]). SCX-Kartuschen können durch Spülen mit Methanol und anschließend mit genügend Wasser leicht konditioniert werden. Die gesammelten organischen Isolate müssen vor dem Reinigungsschritt bis zur Trockene eingeengt werden. Der lösungsmittelfreie Rückstand kann dann mit wenig Salzsäure direkt auf die Kartusche gegeben werden. Die Entfernung eines großen Teils der nicht am Ionenaustauscher gebundenen Verunreinigungen ist durch mehrmalige Waschschriffe, erst mit verdünnter Salzsäure und dann mit

Wasser, möglich. Die Wahl der Benzylpropylsulfonsäure (SCX) statt der Propylsulfonsäure (PRS) als Ankergruppe ermöglicht ein Waschvolumen an verdünnter Salzsäure eines Vielfachen des Kartuschenvolumens. Die an der Säule gebundenen HAAs lassen sich dann mit ammoniakalischer Methanol-Lösung eluieren. Das Eluat enthält zwar noch einige wenige Begleit-substanzen, die aber durch die nachgeschaltete Chromatographie abgetrennt werden können bzw. die spezifische Detektion der HAAs nicht stören. Die Propylsulfonsäure (PRS)-SPE-Kartuschen, wie sie früher verwendet wurden, retenieren größere Mengen an Dichlormethanol-löslichen polaren Störsubstanzen, die während der Detektion mit den HAAs interferieren können [Lit. 85].

Soll die Bestimmung der HAAs nach HPLC-Trennung mit einem elektrochemischen Detektor erfolgen, ist der Gehalt an Salzen gering zu halten, um das chemische Rauschen zu minimieren. Außerdem kann bei stark erhöhter Salzkonzentration die Spannung der Referenzzelle (siehe Kapitel 2.3.6.4 Abschnitt III) nicht mehr konstant gehalten werden. Ein Entsalzen ist über eine C<sub>18</sub>-SPE-Kartusche problemlos möglich. Dazu muss lediglich das Eluat der SCX-Kartusche nach Einengen am Rotationsverdampfer bis zur Trockene in wenig konzentrierter Ammoniaklösung (25 %) aufgenommen und auf die Kartusche gegeben werden. Mit 0,1 N Ammoniak-Lösung kann gewaschen und mit ammoniakalischem Methanol eluiert werden. Das Eluat wird wiederum bis zur Trockene eingengt und kann in einem beliebigen Lösungsmittel wieder aufgenommen werden.

## **2.2 Eigene Arbeitsschritte zur quantitativen Extraktion, Isolierung und Aufreinigung**

### **2.2.1 Extraktion im Säuren mit nachgeschalteter Flüssig-Flüssig-Verteilung**

In den eigenen Arbeiten wurde die Extraktion im Säuren durchgeführt, da so in Vorversuchen die beste Wiederfindung erreicht wurde. Bei den Vorversuchen wurde eine definierte Menge an MeIQx, 7,8-MeIQx und 4,7,8-TriMeIQx mit Methanol auf mikrokristalline Cellulose, das Trägermaterial für spätere Modellsysteme (siehe dazu Kapitel 3), aufgezogen, das Methanol am Rotationsverdampfer entfernt und anschließend in Teilproben aufgeteilt. Entsprechende Teilproben wurden mit den Extraktionsmitteln Methanol, Natronlauge (1 N) oder Salzsäure (1 N) extrahiert. Die verschiedenen Extrakte wurden bis zu Trockene eingengt, in Methanol aufgenommen und direkt zu HPLC-DAD eingesetzt. Es ergaben sich Wiederfindungen von 80 % (Methanol), 89 % (1 N Natronlauge) und 90 % (1 N Salzsäure).

Zur routinemäßigen Bestimmung der HAAs in den eigenen Arbeiten wurden die entsprechenden Analysenproben (Modellsysteme bzw. Realproben wie Fleischextrakt oder Reaktionsaromen) mit einer definierten Menge des als inneren Standards gewählten 4,7,8-TriMeIQx (vgl. Ausführungen zur Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung in Kapitel 2.3.3.5) versetzt und mit 1 N Salzsäure unter kräftigem Rühren (12 h, RT) extrahiert. Die durch Zentrifugation und Filtration gewonnenen sauren Extrakte wurden durch Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan aufgereinigt. Mögliche saure Bestandteile sowie lipophile Störmatrix gehen in die Lösungsmittelphase über. Die basischen, in protonierter Form vorliegenden HAAs verbleiben in der wässrigen Phase. Schüttelt man drei Mal mit 50 ml Dichlormethan aus, so erreicht man eine nahezu vollständige Abtrennung o. g. Störmatrix. Verluste an extrahierten HAAs halten sich in Grenzen. In einer weiteren nachfolgenden Verteilung mit Dichlormethan im basischen Milieu bei pH 11 werden die Analyten isoliert. Die HAAs liegen oberhalb eines pH-Wertes von 10 vollständig deprotoniert vor, sodass sie in dieser relativ unpolaren Form sehr gut in Dichlormethan löslich sind. Viele störende Bräunungsprodukte – häufig mehrfach geladen – verbleiben in der wässrigen Phase.

### **2.2.2 Aufreinigung an SCX-SPE**

Zur Aufreinigung der gewonnen Isolate vor der analytischen Auftrennung und Bestimmung der HAAs wurde u. a. die Festphasenextraktion (SCX-SPE) genutzt. Diese Methode ermöglicht eine selektive Extraktion der interessierenden Komponenten. Gegenüber möglichen weiteren, mit anderen Lösungsmitteln durchgeführten Flüssig-Flüssig-Verteilungsschritten oder weiterer Aufreinigung über semipräparative HPLC hat man hierbei vor allen Dingen einen geringeren Lösungsmittelverbrauch und einen erheblichen Zeitgewinn. Aufgrund der einfachen Handhabung bietet sich zudem eine Automatisierung dieses Aufreinigungsschrittes an.

Zur Aufreinigung wird das durch Flüssig-Flüssig-Verteilungsschritte gewonnene Isolat in wenig heißer 0,1 N Salzsäure aufgenommen und direkt auf die SCX-SPE-Kartusche gegeben. Ein Waschschrift mit 0,1 N Salzsäure reinigt die am Austauschharz gebundenen Analyten von mitgeführten, bisher noch nicht abtrennbaren Matrixbestandteilen. Da es sich bei der Benzylpropylsulfonsäure um Ankergruppen mit hoher Affinität zu den HAAs handelt, sind Waschvolumina von über 40 ml möglich. Nach einem Zwischenwaschschrift mit ausreichend bidestilliertem Wasser lassen sich die Analyten mit ammoniakalischer Methanol-Lösung eluieren. Das Eluat enthält neben den Analyten nur noch wenige (störende) Verbindungen, die jedoch durch nachfolgende chromatographische Trennverfahren (HPLC bzw. GC nach Derivatisierung) abgetrennt werden können und so die Detektion der HAAs nicht stören.

## 2.3 Nachweis- und Bestimmungsmethoden

### 2.3.1 Überblick über publizierte Methoden

Der Nachweis und die Bestimmung von Analyten ist vielfach auf verschiedene Weise möglich. Ferner gibt es – wenn man sich die Analytik der HAAs betrachtet – biochemische Analysenverfahren wie spezielle Mutagenitätstests und Immonoassays neben den traditionellen chromatographischen Trennverfahren wie Kapillarelektrophorese an belegten Kapillaren, Hochdruckflüssigkeitschromatographie sowie Gaschromatographie. Zahlreiche Forschergruppen haben unterschiedliche biochemische und chromatographische Trennmethoden entwickelt, optimiert und validiert, sodass im Folgenden ein umfassender Überblick möglich ist. In den vergangenen Jahren ist, wie in anderen Bereichen der Analytik auch, die quantitative Bestimmung unter Nutzung moderner Massenspektrometer vorangetrieben worden. Die Methodenentwicklung ist so weit vorangeschritten, dass routinetaugliche Analysenmethoden zur Verfügung stehen. Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Analysenmethoden wurden für die eigenen Versuche die jeweils geeignetsten ausgewählt und entsprechend der vorliegenden Problemstellung modifiziert bzw. weiterentwickelt.

### 2.3.2 Mutagenitätstest

In der ersten Phase der Entdeckung der HAAs in den frühen Achtzigerjahren wurde nach neuen mutagenen Verbindungen noch nicht gezielt mit gekoppelten spektroskopischen Verfahren nach entsprechender Isolierung und Aufreinigung gesucht. Stattdessen wurde versucht, durch Mutagenitätstests an verschiedenen Isolaten und Reaktionsansätzen einen Hinweis auf ein Vorhandensein von mutagenen Verbindungen zu erhalten. Es gibt mehrere Testverfahren, um die Mutagenität einer Verbindung oder einer Reaktionsmischung zu bestimmen.

Zunächst wurden Langzeit-Fütterungsversuche [Lit. 217] an Mäusen, Ratten und nicht menschlichen Primaten durchgeführt. Anhand des Krebsbefalls in verschiedenen untersuchten Organen zeigten sich Hinweise auf cancerogene Stoffe in Lebensmitteln, zu denen auch die HAAs zählen.

Das am häufigsten genutzte Testsystem ist der so genannte Ames-Test [Lit. 8, 179], im englischsprachigen Raum auch Ames/Salmonella assay genannt. Dabei handelt es sich um einen einfach durchzuführenden Kurzzeitmutagenitätstest, der auch als Test für Carcinogene verwendet wird. Einen umfassenden Überblick über die Nutzung des Ames-Tests zur Beschreibung der mutagenen Eigenschaften von Umweltchemikalien und Kontaminanten in Lebens- und Futtermitteln findet man in einem Übersichtsartikel von Kubo und Urano [Lit. 146].

Der Ames-Test benutzt verschiedene Histidin-Mangelmутanten des Bakteriums *Salmonella typhimurium*, die kein Histidin synthetisieren und sich daher auf histidinfreiem Medium nicht vermehren. Eine Rückmutation zum Wildtyp – auch als Reversion bezeichnet – kann durch mutagene Substanzen und Strahlung induziert werden. Die so entstehenden Revertanten können dann auf histidinfreiem Medium wachsen. Dabei entspricht die Anzahl der Kolonien, die auf einem mit der entsprechenden *Salmonella*-Bakteriensuspension angeimpften, histidinfreien Nährmedium wachsen, dann der Anzahl der Revertanden. Die Bedeutung des Ames-Testes liegt in der relativ guten Übereinstimmung mit Tierversuchen. In einer Erhebung von Uhde und Macholz [Lit. 300] waren etwa 90 % der als Carcinogene klassifizierten Substanzen im Ames-Test positiv. Es hat sich herausgestellt, dass die Anzahl der Revertanden mit der Wirkstärke des Mutagens korreliert. Wenn die Wirkstärke von Mutagenen wie den HAAs bekannt ist, kann ihre Konzentration in der zum Test verwendeten Lösung abgeschätzt werden. Wie in Kapitel 1.1.1 bereits beschrieben, bedarf es einer metabolischen Aktivierung, damit die HAAs im Säugetierorganismus ihre mutagene Wirkung entwickeln. Um dieses nachzuahmen, wird ein Rattenleberextrakt, der so genannte „S9-Mix“, bei den Testansätzen hinzugefügt. Dieser S9-Mix enthält mischfunktionelle Oxidasen und die Cytochrome P-448 und P-450. Diese Enzyme und Cofaktoren sind auch am Metabolismus der HAAs im menschlichen Körper beteiligt. Am *Salmonella typhimurium*-Stamm TA98 hat man besonders viele Mutationen bei Exposition mit HAAs enthaltenden Lösungen und Reaktionsansätzen gefunden. Dieser *Salmonella*-Stamm ist durch eine hohe Konzentration von endogen produzierter Acetyltransferase gekennzeichnet. Die Acetyltransferase ist maßgeblich am Metabolismus der HAAs beteiligt. Deshalb werden noch weitere Stämme, die noch höhere Konzentrationen an Acetyltransferase aufweisen – wie TA100 – neben dem Stamm TA98 eingesetzt.

### **2.3.3 Immunoassay**

HAAs können mittels monoklonarer Antikörper in einem Immunoassay nachgewiesen und bestimmt werden. Entsprechende Testverfahren, die auf der Grundlage eines kompetitiven ELISA ablaufen, sind für IQ, IQx, MeIQx und 4,8-DiMeIQx getestet und validiert worden [Lit. 305].

### **2.3.4 Kapillarelektrophorese**

Die Kapillaronenelektrophorese, kurz CEZE genannt, ist von Wu et al. [Lit. 317, 318] erstmals für die Trennung einer Standardmischung, bestehend aus 13 HAAs, genutzt worden. Da

eine unbelegte Quarzkapillare (fused-silica) verwendet worden ist, handelt es sich hierbei nicht um eine chromatographische, sondern um eine reine elektrophoretische Trennung. Das Grundprinzip bei dieser Trennung basiert auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit verschiedener geladener HAAs im elektrischen Feld, das an den Enden der fused-silica Kapillare angelegt ist. Da die Kapillare mit einem sauren Puffer/Methanol-Gemisch gefüllt ist, liegen die HAAs in protonierter Form als positiv geladene Moleküle vor. Eine Identifizierung der Analyten ist über deren UV-Absorption (CE-UV, CE-DAD), über laserinduzierte Fluoreszenz (CE-LIF), über ihr Redoxverhalten im elektrochemischen Detektor (CE-EC) oder ihre spezifische Massenfragmentierung in einem über ein Interface gekoppelten Massenspektrometer (CE-ESI-MS) möglich. Wu et al. [Lit. 316] gelang der Nachweis und die Bestimmung verschiedener HAAs aus Regenwasser mit CE-DAD. Schwierigkeiten hinsichtlich der Peakidentifikation bei der Analytik komplexer Matrices (vgl. Puignou [Lit. 229]) schränken die Möglichkeit der Nutzung der CE bei der HAA-Analytik erheblich ein. Erst durch den Einsatz von belegten Quarzkapillaren und Puffern mit mizellbildenden Reagenzien (micellar electrokinetic chromatography, MEKC) gelang es Olsson et al. [Lit. 218], HAAs in aufgearbeitetem Bratensatz von Rindfleisch zu bestimmen. Mit dem verstärkten Aufkommen von praxistauglichen CE-MS-Geräten konnten mit kapillarelektrophoretischen Trenntechniken Nachweisgrenzen im ng/kg-Bereich erreicht werden [Lit. 351]. Für die eigenen Untersuchungen wurde die beschriebene Methode nicht verwendet, da sie zu aufwendig ist.

### **2.3.5 Hochdruckflüssigkeitschromatographie**

#### **2.3.5.1 Trennprinzip**

Chromatographische Methoden, in denen die stationäre Phase fest bzw. an einen Träger immobilisiert, die mobile Phase aber flüssig ist, unterteilt man im Wesentlichen in die Verteilungschromatographie, Adsorptionschromatographie, Ionenaustauscher- und die Ausschluss- bzw. Gelchromatographie.

Die Effizienz der Trennsäule während der chromatographischen Trennung steigt durch Erniedrigung des Partikeldurchmessers der Säulenpackung. Trennungen an Partikeln mit 3-10 µm Durchmesser setzen komplexe Trennsysteme voraus. Man spricht deshalb in diesem Zusammenhang auch von der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC).

In der HPLC müssen aufgrund der hohen Packungsdichte in den Trennsäulen hohe Drücke bis 300 bar aufgewendet werden, um angemessene Fließgeschwindigkeiten und damit auch kurze und scharfe Trennungen der Analyten zu erreichen. Man spricht daher auch häufig bei der HPLC von der „high pressure liquid chromatography“. Am gebräuchlichsten ist die Trennung an auf modifiziertem Kieselgel chemisch gebundenen Phasen. Dabei handelt es sich um eine Verteilungschromatographie.

### **2.3.5.2 Aufbau der in den eigenen Arbeiten verwendeten Trennsysteme**

- I. HPLC mit Diodenarray-Detektor (DAD), gekoppelt mit fluorimetrischem oder elektrochemischem Detektor

In den eigenen Arbeiten wurde ein HPLC-DAD-Trennsystem verwendet, dem ein fluorimetrischer oder elektrochemischer Detektor nachgeschaltet werden kann.

Die verschiedenen Laufmittel wurden durch eine selbstansaugende quaternäre Gradientenpumpe aus 2,0 l Vorratsbehältern gefördert. Durch die Wahl geringer Flussraten war es möglich, bis zu 5 bis 6 Tage ohne Unterbrechung zu analysieren. Durch einen kontinuierlich arbeitenden Degaser wurde möglicherweise im Laufmittel gelöstes Gas vor Eintritt in die HPLC-Pumpe entfernt. Durch das Arbeiten mit geringen Flüssen von 0,1 bis 0,3 ml/min, wurde versucht, die Länge der Verbindungskapillaren aus Edelstahl auf ein Minimum zu reduzieren. Der Durchmesser der Kapillaren ist mit 0,17 mm dem verminderten Fluss angepasst. Spezielle Verbindungsfittings garantieren einen totvolumenfreien Einbau. Um die Retentionszeiten bei gleichem Laufmittelgradienten konstant zu halten, wurde die Säule mit einem Thermostatisierofen stets auf 20 °C temperiert. Die Steuerung des gesamten HPLC-Systems sowie die Auswertung der Rohdaten vom DAD erfolgte über die HSM-Auswertesoftware der Merck KGaA, jetzt VWR International GmbH (Version 4.1). Ein von dieser Software ansteuerbares Gerätekommunikationsinterface mit Analog/Digitalwandler ermöglichte es, die Signale des fluorimetrischen bzw. des elektrochemischen Detektors zeitgleich zu den DAD-Signalen aufzuzeichnen. Die Mess- und Steuerparameter des HPLC-DAD-Trennsystems sind unter Kapitel 6.8.1.1 verzeichnet.

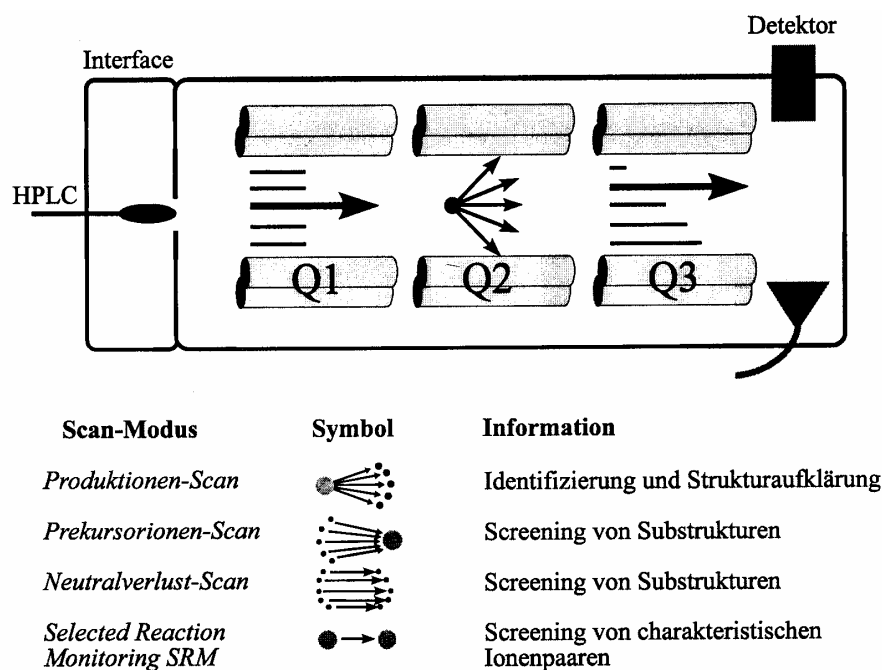


## II. HPLC-ESI-MS/MS

In den eigenen Arbeiten wurden für LC-MS-Messungen Kopplungen einer Agilent 1100 HPLC-Anlage (Agilent Technologies Deutschland GmbH) mit einem QuattroLC<sup>TM</sup>-Massenspektrometer der Micromass GmbH, jetzt Waters GmbH bzw. mit einem 4000 Q Trap<sup>TM</sup>-Massenspektrometer der Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH über entsprechende Elektronenspray-Interfaces genutzt. Die Steuerung des gesamten Systems erfolgte über die jeweilige Herstellersoftware MassLynx bzw. Analyst. Entsprechende Mess- und Steuerparameter der verwendeten HPLC-MS/MS-Trennsysteme sind unter 6.8.2.1 verzeichnet.

Bei den verwendeten Massenspektrometern handelt es sich um Quadrupol-Massenspektrometer, die in den Achtzigerjahren mit der gleichzeitigen rasanten Entwicklung geeigneter Ionenquellen für die Etablierung der HPLC-MS in der instrumentellen Analytik sorgten. Über diese Entwicklung informieren verschiedene Übersichtsartikel von Nissen et al. [Lit. 210, 211]. Das Prinzip eines Quadrupol-Massenspektrometers ist detailliert in Kapitel 2.3.7.2 Abschnitt III. beschrieben. Der aus der HPLC eluierende Lösungsmittelfluss wird über das Elektrosprayinterface (ES) zum Massenspektrometer transferiert. Dabei wird die Probe durch elektrostatische Zerstäubung in ein Aerosol überführt. Das Säuleneluat wird dabei in eine konisch zulaufende feine Probenkapillare aus Edelstahl, an der eine Hochspannung von ca. 2 kV bis 5 kV anliegt, geleitet. An der Spitze der Kapillare wird so ein feiner Nebel kleiner geladener Tröpfchen emittiert. Die Polarität der geladenen Tröpfchen wird von der Polarität der Hochspannung bestimmt. Daher unterscheidet man zwischen ES(+) oder ES(-)-Experimente. In den Tröpfchen liegen neben einigen geladenen Probenmolekülen ( $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$ ) besonders die geladenen Ionen des protischen Laufmittels der HPLC vor. Die Probenkapillare wird zusätzlich an ihrem Ende mit Stickstoff, dem so genannten „desolvation gas“ umspült. Beim Gerät der Micromass GmbH wird der Stickstoff bereits vor Auftreffen auf die Kapillare auf etwa 250 °C bis 300 °C beheizt. Bei dem Gerät der Firma Applied Biosystems erwärmen speziell ausgerichtete Heizstrahler, deren Oberfläche auf bis zu 700 °C aufgeheizt werden kann, den die Aerosoltröpfchen umspülenden Stickstoff. Durch diese Wärmezufuhr wird das allmähliche Verdampfen des Lösungsmittels herbeigeführt. Es kommt zum Anstieg der Ladungsdichte an der Oberfläche des Primärtröpfchens. Als Folge kommt es zur Ausbildung immer kleinerer Tröpfchen (vgl. Theorie von Kebarle und Tang, [Lit. 131]). Mit kleiner werdenden Tröpfchen lagern sich immer mehr geladene Ionen des protischen Laufmittels (bei der ES(+) sind es Protonen) an die Probenmoleküle an. Schließlich kommt es zur vermehrten Bildung der Quasimolekülonen  $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$ . In Konkurrenz zu die-

ser Bildungsreaktion steht die entsprechende Ionisierung von Matrixmolekülen. Deshalb ist es für eine optimale Ionenausbeute wichtig, schon mit der HPLC Matrixbestandteile weitestgehend zu entfernen. Diese Bildung der Ionen erfolgt weitestgehend bei Normaldruck. Um die gebildeten positiven oder negativen Ionen in das Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometer zu überführen, werden von den Geräteherstellern verschiedene Techniken angewendet, deren Grundprinzip jedoch immer gleich ist. Durch eine kleine Öffnung in der Mitte einer elektrisch geladenen Metallplatte, die wegen ihrer konischen Bauform auch „Cone“ genannt wird, gelangen die Ionen in ein abgeschlossenes Gerätekompartiment mit vermindertem Atmosphärendruck ( $10^{-2}$  bar bis  $10^{-1}$  bar). Die Strömungsrichtung der abgelenkten Ionen steht dabei senkrecht zur Richtung des durch den gerichteten Einlass des Stickstoffs beschleunigten Molekülstromes. Durch Veränderung der so genannten „Cone voltage“ können nur bestimmte Ionen aus der Gasphase der versprühten und geladenen Probenmoleküle extrahiert werden. Unerwünschte mitionisierte Matrixbestandteile sowie nichtionisierte Probenmoleküle in der Gasphase können so ausgeblendet werden. Im Weiteren werden die Ionen durch ein Hexapol- bzw. Quadrupollinsensystem fokussiert, ehe sie in das eigentliche Analysenkompartiment gelangen. Dieses steht unter Hochvakuum (etwa  $10^{-5}$  bar), damit die zu analysierenden Ionen nicht durch Stöße mit Luftmolekülen abgelenkt werden. Im Analysenkompartiment befinden sich drei seriell gekoppelte Quadrupole (vgl. Abb. 2.1), von denen nur der erste (Q1, Abb. 2.1) und der dritte (Q3) als massenspektrometrischer Detektor fungieren.



**Abbildung 2.1**

Schematische Darstellung des Aufbaus eines Triple-Quadrupol-Tandem-Massenspektrometers sowie mögliche Scan-Techniken.

Durch den als Massenfiter fungierenden Quadrupol können die Ionen aufgrund ihrer Masse entsprechend aufgetrennt werden. Der dazwischen liegende Quadrupol (Q2) dient als Stoßkammer. Alle Ionen passieren diese in Längsrichtung und fragmentieren entweder spontan – dies ist bei metastabilen Ionen der Fall – oder nach Stoßaktivierung mit einem Inertgas wie Argon (Firma Micromass) oder Stickstoff (Firma Applied Biosystems). Diese Stoßaktivierung wird auch „collision activated dissociation“ (CAD) oder „collision induced dissociation“ (CID) genannt. Aufgrund des einströmenden Stoßgases erhöht sich der Druck in Q2 auf  $10^{-3}$  bar. Durch bestimmte Kombinationen der drei Quadrupole kann man verschiedene Betriebsmodi des Massenspektrometers auswählen. Eine genaue Beschreibung der Betriebsmodi sowie auf verschiedene Applikationen angepasste modifizierte Betriebsmodi findet man in der Habilitationsarbeit von Herderich [Lit. 90].

#### a) Produkt-Ionenscan

Bei dem Produkt-Ionenscan werden durch definierte Ansteuerung des ersten Quadrupols aus dem Ionengemisch die interessierenden Molekül-Ionen, auch „Precursor-Ionen“ oder „parents“ genannt, herausgefiltert, d. h. nur diese können Q1 passieren, während andere Molekül-Ionen innerhalb des Quadrupols abgelenkt werden. Die Precursor-Ionen gelangen in die Stoßkammer Q2, in der durch Stoßionisation Produkt-Ionen, auch „Tochter-Ionen“ oder „daughters“ genannt, gebildet werden. Diese werden dann im als Massenfiter fungierenden Q3 nach Molekülmasse aufgetrennt und mithilfe eines dahinter geschalteten Sekundärelektronenvervielfachers (SEV) detektiert. Beim SEV handelt es sich um einen Detektor für energiereiche Teilchen wie Ionen. Diese treffen auf eine Konversionsdynode und lösen dort Elektronen aus. Die Elektronen werden in einem angelegten elektrischen Feld beschleunigt und erzeugen beim Auftreffen wiederum (mehr) Elektronen. Dieser Vorgang wiederholt sich kaskadenartig. Am Ende kann die Menge der Elektronen (Verstärkung etwa um den Faktor  $10^6$ ) als Intensitätssignal gemessen werden.

In den eigenen Arbeiten wurden Messungen im Produkt-Ionen-Scan durchgeführt, um das Fragmentierungsverhalten der per HPLC auftrennbaren HAAs zu ermitteln. Ebenso konnten die Messparameter des entsprechenden Massenspektrometers dahingehend optimiert werden, dass Matrixbestandteile nahezu ausgeblendet werden und selektive SRM-Experimente durchgeführt werden konnten (siehe dazu auch Abschnitt c) dieses Kapitels).

### b) Precursor-Ionen-Scan

Im Precursor-Ionen-Scan, auch Eltern-Ionen-Scan genannt, erfasst Q3 ein selektives Fragmentation. Mit Q1 werden alle höheren Massen untersucht, aus denen das festgelegte Fragmentation durch Stoßionisation in Q2 entstanden ist. Ein Detektorsignal ergibt sich erst, wenn in Q1 ein Ion passieren kann, aus welchem tatsächlich das vorgegebene Fragmentation entstehen kann. Experimente mit Elternionenscan erlauben Rückschlüsse auf die Entstehung bestimmter charakteristischer Fragmentierungsmuster. In den eigenen Arbeiten konnte so die allen Chinoxalinen und Chinolinen innerhalb der Gruppe der Aminoimidazoazaarene gemeinsame Abspaltung von  $-\text{CH}_3-$ ,  $-\text{CH}_3\text{CN}-$  und  $-\text{CH}_3\text{CNHCN}-$ Bruchstücken während der Stoßionisation in Q2 bestätigt werden (vgl. auch Kapitel 2.3.6.1).

### c) Selected Reaction Monitoring (SRM)

Im SRM-Modus wird eine bekannte charakteristische Fragmentierung eines Ions oder auch die Abspaltung eines Neutralteilchens – wie  $\text{CO}_2$  aus Carboxylgruppen,  $\text{CO}$  aus Aldehyden,  $\text{HCl}$  aus chlorierten Verbindungen – genutzt. Das Grundprinzip des SRM ist ein Produkt-Ionen-Scan. Dabei wird in Q1 gezielt durch Einstellung eines definierten Masse-zu-Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) ein Molekülion selektiert und in Q2 durch Stoßionisation charakteristisch fragmentiert. Entstehende Produktionen werden durch Q3 mit nachgeschaltetem SEV erfasst. Ähnlich wie bei Selected-Ion-Monitoring (SIM)-Experimenten in der GC-MS-Analytik (vgl. Kapitel 2.3.7.6 Abschnitt III) wird hierbei der Quadrupol Q3 so angesteuert, dass er in der Funktion als Massenfilter innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit kein komplettes Spektrum – z. B. von  $m/z = 100$  bis  $m/z = 1000$  – liefert, sondern lediglich eine oder mehrere selektive Massen durchlässt. Die Messzeit pro Masse wird dadurch erheblich erhöht, woraus sich eine Empfindlichkeitssteigerung ergibt.

In den eigenen Arbeiten können HAAs sowohl durch die Retentionszeiten der HPLC als auch durch die spezifischen Elternionen und die selektiv erfassten Produktionen identifiziert werden. SRM-Experimente ermöglichen darüber hinaus durch Reduzierung des chemischen Hintergrundrauschens durch koeluiierende Verbindungen und zahlreiche Matrixkomponenten eine präzise quantitative Bestimmung der HAAs.

### 2.3.5.3 Säulen- und Fließmittelwahl

Heterocyclische aromatische Amine lassen sich an unpolaren Umkehrphasen (reversed-phase, RP) mit polaren Lösungsmitteln als Eluenten mittels HPLC gut trennen. Daneben wurden

semipräparative HPLC-Trennungen an in Edelstahlsäulen gefüllten Kationenaustauschermaterialien mit einer Acetonitril-Phosphorsäure/Natriumphosphat-Gradientenelution beschrieben [Lit. 281].

Da HAAs, insbesondere die Chinoline und Chinoxaline, basische Verbindungen sind, ist ihre chromatographische Trennung mittels HPLC nur durch Optimierung mehrerer Trennparameter zufrieden stellend möglich. Durch die Basizität wird nämlich die Peaksymmetrie aufgrund sekundärer Wechselwirkungen mit den noch freien OH-Gruppen des Kieselgelgerüsts stark beeinträchtigt. Dadurch wird eine Detektion besonders von Analyten im Spurenbereich extrem erschwert. Es werden Säulenbelegungen angeboten, die durch Passivierung chemisch so modifiziert sind, dass sie nur noch einige wenige freie OH-Gruppen enthalten. Die Verwendung von Säulen mit einer derartigen Belegung, die häufig auch als „endcapped“ bezeichnet wird, ist zur Vermeidung von Wechselwirkungen anzuraten. Zusätzlich reduziert eine Chromatographie im sauren Milieu ( $\text{pH} < 3,5$ ) die Restaktivität des Sorbens. Noch freie OH-Gruppen liegen so vollständig protoniert vor. Setzt man dem HPLC-Eluenten noch so genannte Modifier zu – das sind niedermolekulare Verbindungen mit hoher Basizität wie Triethylamin – so ist kaum noch mit einer Beeinträchtigung aufgrund von Wechselwirkungen der Analyten mit dem Säulenmaterial zu rechnen. Ein Überschuss an Modifier – ein 0,01 N-Zusatz zum Eluenten ist üblich – sorgt dafür, dass das Sorbens noch zusätzlich passiviert wird. Durch einen bestimmten Zusatz an Phosphorsäure kann der pH-Wert des Laufmittels genau eingestellt werden. Es ist dann ein Triethylamin-Phosphat-Puffersystem (TEAP-Puffer) entstanden. Verwendet man zur chemischen Modifizierung der Kieselgel-Trennphase statt eines  $\text{C}_{18}$ -Silanes ein  $\text{C}_8$ -Silan, so kann aufgrund der kleineren Molekülstruktur eine bessere Abdeckung der Kieselgeloberfläche – auch Kohlenstoffbelegung genannt – und somit eine bessere Abschirmung der OH-Gruppen erreicht werden. Die chromatographische Verteilungschromatographie am Sorbens wird durch diese Modifizierung der Trennphase nicht beeinflusst.

In den eigenen Arbeiten wurde eine von der Firma MZ-Analytik gefüllte Edelstahlsäule mit 250 mm Länge und 3 mm Durchmesser genutzt. Das Füllmaterial – Superspher RP-select B mit 4  $\mu\text{m}$  Korngröße – wurde von der Firma Merck bezogen. Zum Schutz der Hauptsäule wurde eine Vorsäule (Merck, LiChrospher RP-select B, 4x4 mm, 5  $\mu\text{m}$  Korngröße) vorgeschaltet. Sie kann bei Bedarf ausgewechselt werden. Die geringen Abmessungen der Trennsäule ermöglichen niedrige Flussraten von 0,1 bis 0,3 ml/min. Dies hat den Vorteil, dass erhebliche Mengen von meist umweltgefährdenden Lösungsmitteln eingespart werden können. Bei Verwendung derartiger Trennsäulen muss jedoch in Kauf genommen werden, dass die

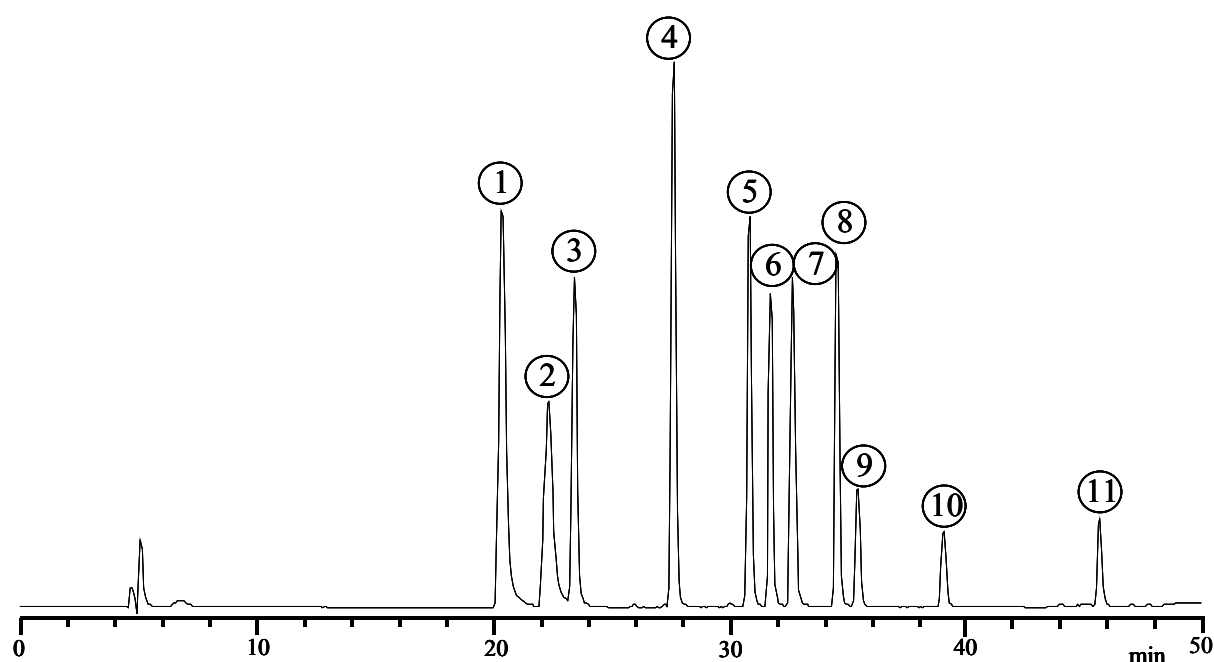
Rekonditionierung der Säule, die etwa nach 150 Läufen vorgenommen werden muss, sowie die Equilibrierung der Säule und des gesamten Trennsystems aufgrund der niedrigen Flussraten längere Zeit in Anspruch nimmt. Da man aber mit einem Vorrat von je 2 l des entsprechenden Laufmittels 5 bis 6 Tage ohne Unterbrechung analysieren kann, wird diese längere Vorbereitungszeit durch geringere Standzeiten relativiert. Da in den eigenen Arbeiten die weitere Absicherung der Analysenergebnisse per GC-MS der silylierten HAAs erfolgte, wurde entgegen der in der Routineanalytik üblichen Praxis keine Trennung an einer weiteren HPLC-Säule anderer Polarität durchgeführt. Zum Einsatz könnte eine säurestabile, sterisch passivierte Phenyl-Säule der Firma HP (SB-Phenyl 5 $\mu$ m, 4,6x250 mm) kommen, wie sie auch von Vollenbröcker [Lit. 307] in seinen Arbeiten eingesetzt wurde. Diese Phenylphase zeigt neben der guten Passivierung auch ein abweichendes Retentionsverhalten, da im Gegensatz zur reinen Lipophilie der C<sub>8</sub>- bzw. C<sub>18</sub>-Umkehrphase eine durch das  $\pi$ -Elektronensystem verursachte Wechselwirkung mit dem aromatischen Teil der Analysesubstanzen entsteht. Auch die Verwendung von Säulen gleicher Abmessung mit pentafluorierten Phenylphasen (z. B. Discovery HS F5, Firma Supelco) als Sorbens, wie sie in der Drogenanalytik häufiger eingesetzt werden, ist denkbar.

Für die Trennung an RP-Phasen bzw. Phenylphasen hat sich ein saurer TEAP-Puffer etabliert. In Kombination mit einem linearen Gradienten gegen Acetonitril beschreiben Gross und Grüter [Lit. 75] die Auftrennung von Standardgemischen sowie aufgearbeiteten Proben in scharfe symmetrische Peaks, die so eine hohe Nachweisempfindlichkeit ermöglichen.

Das von Gross und Grüter beschriebene Fließmittel wurde in den eigenen Arbeiten durch Einstellen einer 0,01 M Lösung von Triethylamin mit Phosphorsäure auf pH 3,3 hergestellt. Da freies Triethylamin jedoch rasch Oxidationsprodukte bildet, kann dieses nicht als Pufferkomponente in Verbindung mit einem elektrochemischen Detektor verwendet werden, da entstehende Oxidationsprodukte in der Detektorzelle hohe Grundströme erzeugen können. Daher sollte das Laufmittel möglichst wenig freies Triethylamin enthalten. Käufliche TEAP-Puffer erfüllen dieses Kriterium.

In den eigenen Arbeiten wurde zunächst ein Gradientensystem aus einem TEAP-Puffer und Acetonitril genutzt. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass die Solvatation von Acetonitril in wässrigen Puffern endotherm verläuft. Da erst unmittelbar vor den Pumpenköpfen der HPLC-Pumpe die verschiedenen Laufmittel aufeinandertreffen, würde sich das Laufmittelmisch stark abkühlen. Nicht reproduzierbare Retentionszeiten wären die Folge. Dabei

beeinflusst die Temperatur des Eluenten unspezifisch die chromatographische Verteilung der Analyten am Sorbens. Um dies zu verhindern, wurde eine binäre Gradientenelution mit jeweils zwei Laufmittelkomponenten durchgeführt. Laufmittel A bestand aus einem TEAP-Puffer (0,01 N), der mit Phosphorsäure auf pH 2,8 eingestellt wurde. Laufmittel B war ein Gemisch aus 50 % Laufmittel A und 50 % Acetonitril, da auf diese Weise eine Abkühlung der mobilen Phase verhindert werden konnte. Der pH-Wert dieser organisch-wässrigen Mischung wurde nach dem Ansetzen stets kontrolliert. Er lag immer bei etwa 3,0. Es wurde ein mehrstufiger Gradient gefahren (Start: 96 Teile A+4 Teile B; 30 min: 50+50; 40 min: 10+90; Plateau bis 50 min: 10+90; 55 min: 96+4; Equilibrierung der Säule bis 75 min: 96+4). Eine entsprechende Trennung eines HAA-Standardgemisches ist in Abbildung 2.2 zu sehen.



**Abbildung 2.2**

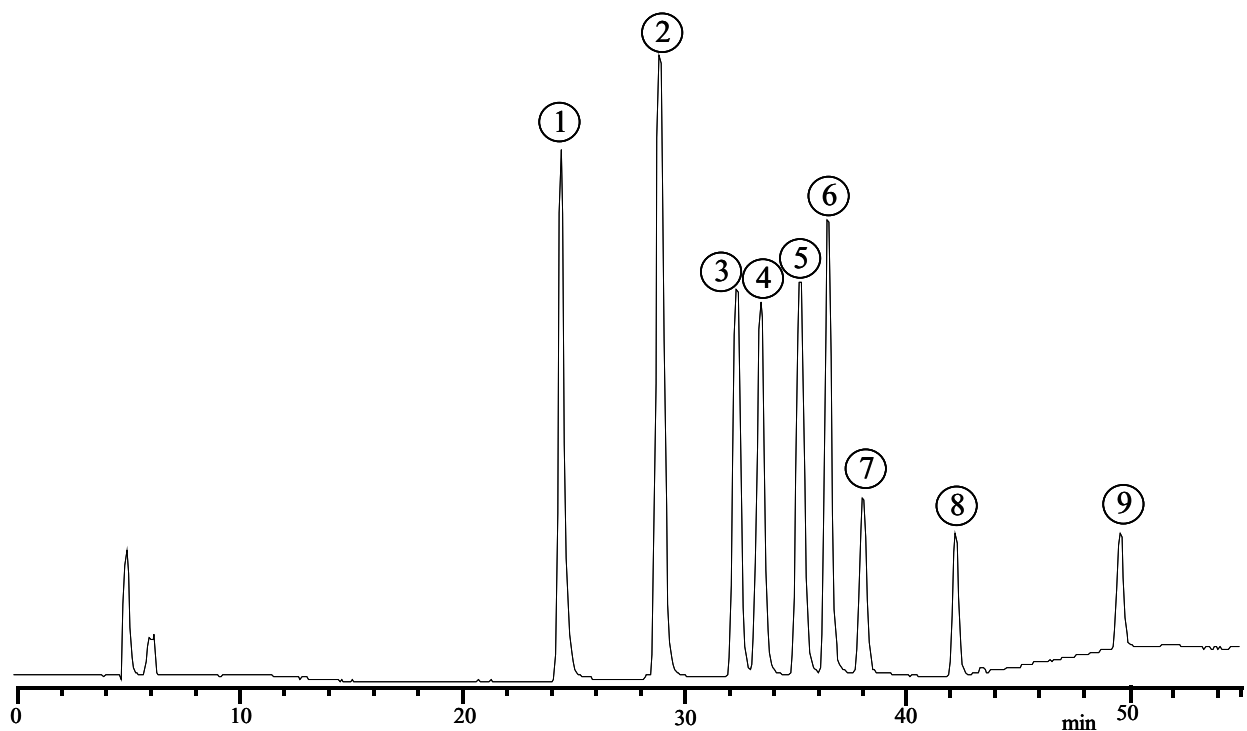
HPLC-Chromatogramm von elf HAAs (Reinsubstanzen); Gerät: HPLC1 (6.8.1.1); LiChrospher 100 RP-18e (4 $\mu$ m); 250 x 3 mm; Mobile Phase A: TEAP-Pufferlösung (10 mM, pH 2,8); mobile Phase B: Acetonitril/TEAP-Pufferlösung (pH 2,8) 50/50 (v/v); Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 96+4, 30 min: 50+50, 40 min: 10+90, 50 min: 10+90, 55 min: 96+4, 75 min: 96+4; DAD-Detektion bei  $\lambda=265$  nm, Flussrate 0,3 ml, Injektionsvolumen 5  $\mu$ l; IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8-DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harmann (9), PhIP (10), MeA $\alpha$ C (11)

Im Rahmen der eigenen Arbeiten sollten Ergebnisse, die durch HPLC-DAD-Bestimmungen gewonnen werden konnten und durch GC-MS der silylierten HAAs abgesichert worden sind, zusätzlich noch durch HPLC-ESI-MS/MS bestätigt werden. Im ESI-Interface wird das Laufmittel im Stickstoffstrom unter Anlegen eines Vakuums bei einer Temperatur von über 300 °C entfernt. Laufmittel, die wie der TEAP-Puffer nichtflüchtige Komponenten enthalten, sind für die HPLC-ESI-MS/MS-Analytik daher völlig ungeeignet. In der Literatur sind HPLC-Trennungen mit Ameisensäure (0,05 %)/Acetonitril-Gradienten [Lit. 235], mit Trifluo-

ressigsäure (0,05 %)/Methanol/Acetonitril-Gradienten [Lit. 233], Ammoniumacetatlösung (0,05 M)/Acetonitril [Lit. 220] und von Toribio et al. mit einem Gradienten aus Ammoniumformiatlösung (0,03 M, pH 3,25)/Ammoniumformiatlösung (0,03 M, pH 3,7)/Acetonitril [Lit. 292] mit gekoppeltem Massenspektrometer beschrieben.

Da Hofmann [Lit. 99] mit einem binären Gradienten, bestehend aus einer eingestellten wässrigen Ammoniumformiatlösung und Acetonitril, eine zufrieden stellende Trennung von Chinoxalinen, die aus der Umsetzung von Hexose- und Pentoseabbauprodukten mit o-Phenylendiamin gebildet worden sind, erreichen konnte, wurde versucht, die von ihm gewonnenen Erkenntnisse auf die Trennung der strukturverwandten HAAs (Chinoline, Chinoxaline) zu übertragen.

Durch zahlreiche Testläufe gelang es, einen der Trennung mit TEAP-Puffern gleichwertigen HPLC-Lauf mit einem binären Laufmittelgemisch (Laufmittel A, Laufmittel B) zu entwickeln (vgl. auch Goldbeck [Lit. 69]).



**Abbildung 2.3**

HPLC-Chromatogramm von elf HAAs (Reinsubstanzen); Gerät: HPLC1 (6.8.1.1); LiChrospher 100 RP-18e (4 $\mu$ m); 250 x 3 mm; Mobile Phase A: Ammoniumformiat-Pufferlösung (10 mM, pH 3,2); mobile Phase B: Acetonitril/Ammoniumformiat-Pufferlösung (pH 3,2) 50/50 (v/v); Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 90+10, 30 min: 45+55, 40 min: 0+100, 55 min: 0+100, 60 min: 90+10, 80 min: 90+10; DAD-Detektion bei  $\lambda=265$  nm, Flussrate 0,3 ml, Injektionsvolumen 5  $\mu$ l; IQ (1), IQx (2), MeIQ (3), MeIQx (4), 7,8-DiMeIQx (5), 4,8-DiMeIQx (6), Norharman (7), 4,7,8-TriMeIQx (8), Harmann (9), PhIP (10), MeA $\alpha$ C (11).



Laufmittel A bestand aus einem wässrigen Ammoniumformiatpuffer (0,01 M), der mit Ameisensäure auf pH 3,2 eingestellt wurde. Laufmittel B war ein Gemisch aus 50 % Laufmittel A und 50 % Acetonitril. Der pH-Wert dieser organisch-wässrigen Mischung wurde nach dem Ansetzen ebenfalls mit Ameisensäure auf 3,0 eingestellt. Es wurde ein mehrstufiger Gradient gefahren (Start: 90+10; 30 min: 45+55; 40 min: 0+100; Plateau bis 55 min 0+100; 60 min: 90+10; Equilibrierung der Säule bis 80 min: 90+10). Eine Trennung eines HAA-Standardgemisches ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

#### 2.3.5.4 Geeignete Detektoreinheiten für die Bestimmung der HAAs mittels HPLC

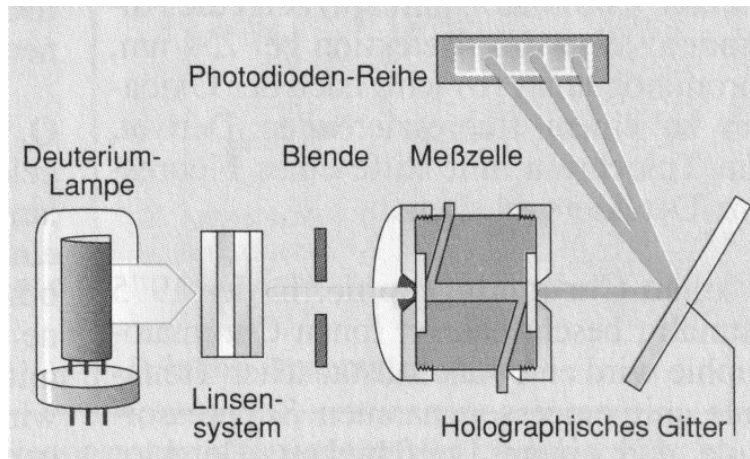
In den eigenen Arbeiten wurden die im Folgenden beschriebenen Detektoreinheiten hinsichtlich der Anwendbarkeit und Präzision getestet und bewertet, um die für die durchgeführte Routineanalytik geeignetste Bestimmungsmethode zu ermitteln.

##### I. UV/DAD-Detektion

Da HAAs aufgrund ihres aromatischen Charakters ein oder mehrere konjugierte  $\pi$ -Elektronensysteme besitzen, die im UV-Bereich Strahlung absorbieren, kann diese Eigenschaft für ihren Nachweis und ihre Bestimmung genutzt werden. Die der HPLC üblicherweise nachgeschalteten Detektoreinheiten sind der UV- und der Diodenarraydetektor. Der Einsatz dieser Detektoren in der HAA-Analytik wird umfangreich in Übersichtsartikeln von Gross [Lit. 77] bzw. Knize et al. [Lit. 140] beschrieben. Die gemessene Absorption des Lichtes einer bestimmten Wellenlänge ist gemäß dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz der Konzentration proportional, so dass eine quantitative Auswertung möglich ist.

Der Aufbau eines DAD, auch Photodiodenarray-Detektor genannt, ist in Abbildung 2.4 zu sehen.

Der Einsatz eines DAD-Detektors erlaubt einen zusätzlichen Spektrenvergleich, da eine größere Anzahl kleiner Photodioden es ermöglicht, gleichzeitig bei verschiedenen Wellenlängen zu messen. Mit den während eines Laufes mithilfe eines computergestützten Labordatensystems aufgenommenen Rohdaten können zwei- oder dreidimensionale Chromatogramme generiert werden. Bei einem zweidimensionalen Chromatogramm kann für jede aufgenommene Wellenlänge eine Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit erfolgen. Eine derartige Darstellung entspricht dem klassischen Chromatogramm, in dem Peaks integriert werden können, um anschließend anhand ihrer Flächenzahl eine quantitative Auswertung



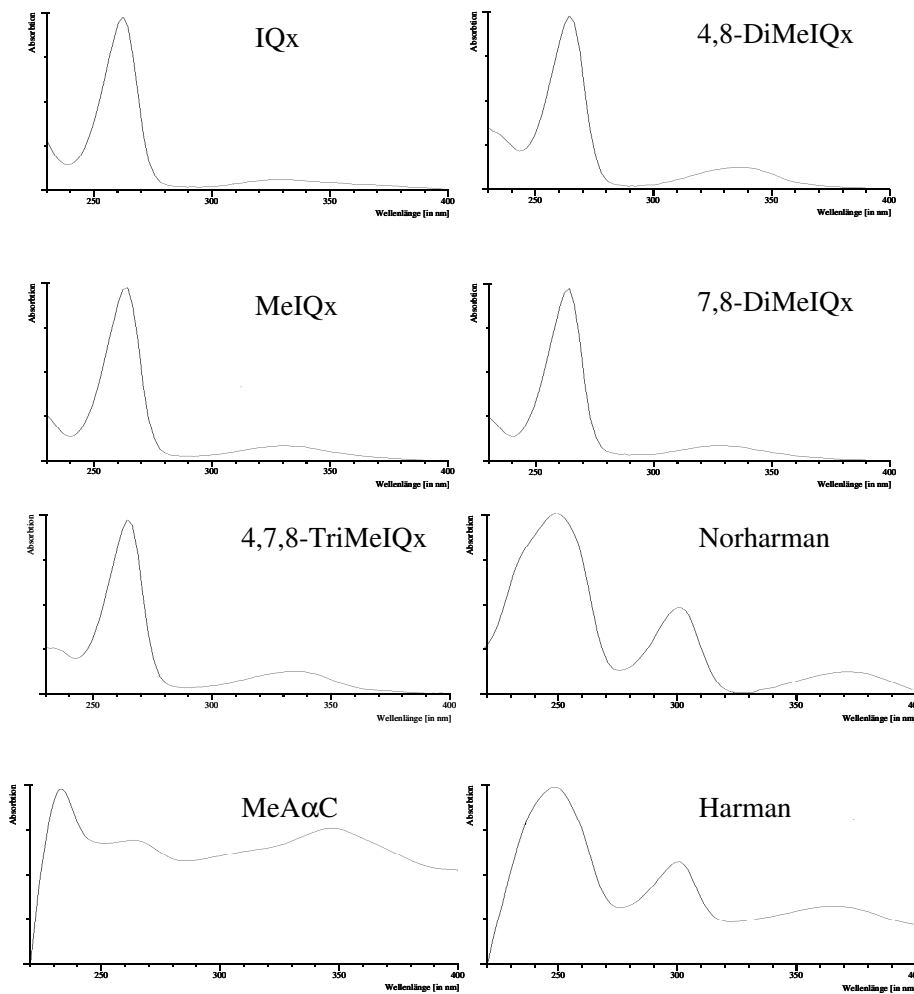
**Abbildung 2.4**

Schematischer Aufbau eines Diodenarray-Detektors

durchzuführen. Ein weiterer zweidimensionaler Auswertemodus ermöglicht die Darstellung der Absorptionscharakteristik in Abhängigkeit von der Wellenlänge (UV-Spektrum) (vgl. Abb. 2.5). Diese kann für jeden Zeitpunkt des aufgenommenen Laufes erfolgen. Verbindungen, die im klassischen Chromatogramm als Peak erscheinen, können so anhand ihrer spezifischen Absorptionscharakteristik identifiziert werden.

Eine dreidimensionale Darstellung der aufgenommenen Daten eignet sich besonders zur Lösung von Trennproblemen. Anhand einstellbarer unterschiedlicher Betrachtungswinkel kann gleichsam anhand der Peak-Topographie beurteilt werden, ob Substanzen klar voneinander getrennt wurden und ob Störungen aus dem Untergrund vorliegen. Oft kann man dies auch schon aus einem vereinfachten 3D-Chromatogramm ablesen. Hierbei ist die Wellenlänge gegen die Zeit aufgetragen. Die entsprechenden Intensitäten der Absorption sind farblich gekennzeichnet. Beispielhaft ist in Abbildung 2.6 ein vereinfachtes 3D-Chromatogramm einer Standardtrennung verschiedener HAAs zu sehen.

Bei der Wahl des Laufmittels ist zu beachten, dass sich durch Veränderung des pH-Wertes nicht nur die Retentionszeiten, sondern auch die chemischen Strukturen der durch die Aminogruppe basischen HAAs beeinflussen lassen. So ist bei Erniedrigung des pH-Wertes ein bathochromer Effekt zu beobachten, d. h. das Absorptionsmaximum verschiebt sich hin zu niedrigen Wellenlängen. Aus der vereinfachten 3D-Darstellung des aus einer Standardlösung getrennten Substanzpeaks von MeIQx bei einem pH-Wert des Laufmittels von 3 (Abb. 2.6) kann man klar ein Absorptionsmaximum im Bereich von  $\lambda = 265$  nm erkennen. Wechselt man den pH-Wert des Laufmittels (vgl. Abb. 2.7), so kann man neben der verschobenen Retentionszeit des MeIQx und der veränderten Peaksymmetrie auch die Verschiebung des

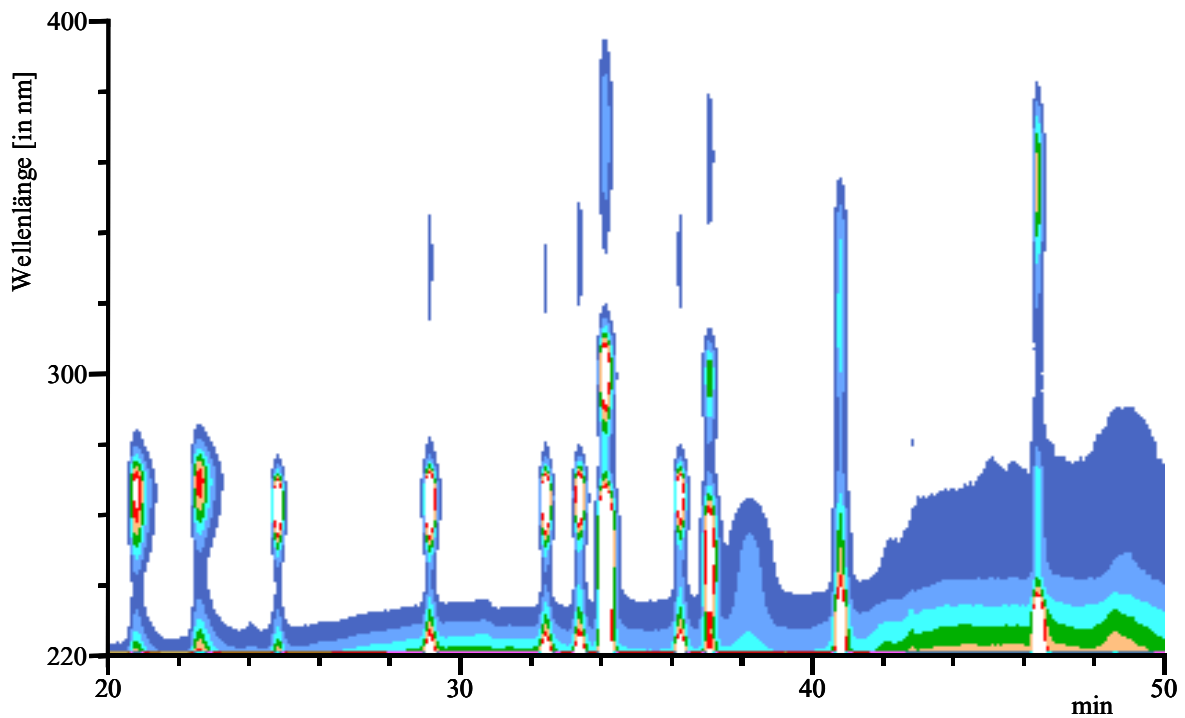


**Abbildung 2.5**  
UV-Absorptionsspektren wichtiger HAAs

Absorptionsmaximums erkennen. Es liegt jetzt etwa bei  $\lambda = 275$  nm. Daher muss, um mit optimaler Empfindlichkeit messen zu können, die Messwellenlänge angepasst werden.

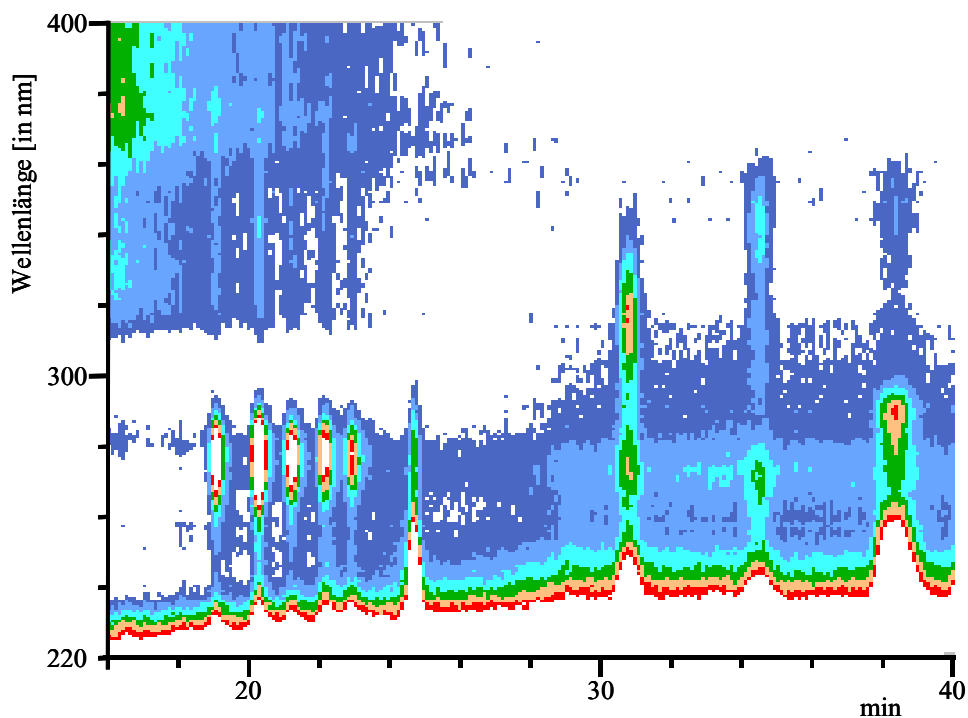
Harman und Norharman zeigen bei einem pH-Wert des Laufmittels zwischen 3 und 4 Maxima bei 245 nm, 295 nm und 360 nm. Das HAA MeA $\alpha$ C kann ebenfalls bei einer Messwellenlänge von 320 nm empfindlich und sehr selektiv detektiert werden. Für die routinemäßige HAA-Analytik wird oft nur eine so genannte „Monitoring Wavelength“ von  $\lambda = 265$  nm gewählt. Die Absorption von Harman, Norharman und MeA $\alpha$ C ist bei dieser Wellenlänge zwar weniger stark ausgeprägt, aber für die Berechnung durchaus nutzbar.

Nach eigenen Erfahrungen stellt ein optimierter HPLC-Lauf in Kombination mit einem empfindlichen wellenlängenjustierten Diodenarray-Detektor die Bestimmungsmethode der Wahl dar, da in einem Lauf alle gängigen HAAs mit hinreichender Genauigkeit und Präzision erfasst werden können. Anhand der Retentionszeit und dem jeweiligen zugehörigen UV-Spektrum lassen sich die HAAs sicher nachweisen. Matrixstörungen, die bei Nicht-Erkennen



**Abbildung 2.6**

Vereinfachte 3D-Darstellung eines HPLC-Laufes; HPLC-Parameter vgl. Abb. 2.2; steigende Intensität von blau über rot zu weiß; Elutionsreihenfolge: IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman, 4,7,8-TriMeIQx, Harman, PhIP, MeAcC.



**Abbildung 2.7**

Vereinfachtes 3D-HPLC-Chromatogramm nach DAD-Detektion; Gerät: HPLC1 (6.8.1.1); LiChrospher 100 RP-18e (4 $\mu$ m); 250 x 3 mm; Mobile Phase A: TEAP-Pufferlösung (10 mM, pH 7,0); mobile Phase B: Acetonitril/TEAP-Pufferlösung (pH 7,0) 50/50 (v/v); Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 80+20, 20 min: 0+100, 50 min: 0+100, 55 min: 80+20, 75 min: 80+20; Flussrate 0,3 ml, Injektionsvolumen 5  $\mu$ l; steigende Intensität von blau über rot zu weiß; Elutionsreihenfolge: IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,8-DiMeIQx, Norharman, 4,7,8-TriMeIQx, Harman, PhIP, MeAcC.

häufig zu erhöhten Gehalten führen können, sind leicht im 3D-Chromatogramm zu bemerken. Es besteht jedoch nicht die Möglichkeit, die Matrixstörungen auszublenden.

## II. Fluorimetrische Detektion

Die Erscheinung der Fluoreszenz ist auf Moleküle zurückzuführen, die bei der Rückkehr von einem angeregten Elektronenzustand in den entsprechenden Grundzustand Strahlung einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Diese Moleküle sind zuvor durch absorbierte Strahlung definierter Wellenlänge angeregt worden. Fluoreszenz tritt meist bei Molekülen auf, die aufgrund ihrer starren und/oder planaren Struktur aufgenommene Strahlungsenergie nicht als Wärme kontinuierlich wieder abgeben können. Bei aromatischen Systemen oder kondensierten Heterocyclen wie den HAAs ist deshalb eine Fluoreszenz bei der Wahl einer geeigneten Anregungswellenlänge zu erwarten [Lit. 250]. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Konzentration der entsprechenden angeregten Moleküle.

Die fluorimetrische Detektion bei HPLC-Trennungen ist jedoch nur bei der Bestimmung von Pyridindolen (Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C und MeA $\alpha$ C) und den Aminoimidazopyridinen wie PhIP möglich (vgl. Gross und Grüter [Lit. 75]). Die Chinoline (IQ, MeIQ) und Chinoxaline (z. B. MeIQx, 4,8-DiMeIQ, etc.) zeigen zwar ebenfalls Fluoreszenz, jedoch liegen die Emissions- und Absorptionswellenlängen zu dicht beieinander. Dadurch ist eine Beeinflussung des Emissionslichtes anzunehmen, weshalb die Emission nur über einen minimalen Wellenlängenbereich detektiert werden kann. Dies führt zu Empfindlichkeitsverlusten und macht eine Messung im Spurenbereich unmöglich (vgl. Wakabayashi et al. [Lit. 150], Nutt [Lit. 213]). So liegt für MeIQx bei einer Anregungswellenlänge von 270 nm das Maximum des Emissionsspektrums bei  $\lambda = 287$  nm. In früheren Publikationen wurde die Ermöglichung einer Steigerung der Empfindlichkeit bei der Analyse von HAAs durch die Kombination einer UV- und einer Fluorimeterdetektoreinheit beschrieben [Lit. 75, 117, 185]. Ein Nachteil dieser Kombination liegt in der möglichen falsch-positiven Detektion der HAAs [HPLC7], da beide Detektoreinheiten aufgrund begrenzter Auswertekapazitäten des jeweiligen Labordatensystems nur mit verminderter Empfindlichkeitseinstellung verwendet werden konnten. Bei den damaligen Geräten waren häufig die Linearitätsbereiche der jeweiligen Detektoren relativ schmal, sodass der effektive Überlappungsbereich begrenzt war.

In den eigenen Arbeiten standen DAD- und Fluorimeter-Detektoreinheiten mit entsprechender rechnergestützter Auswertung zur Verfügung, die problemlos miteinander gekoppelt werden können. In Abbildung 2.8 ist die Trennung einer HAA-Standardmischung zu sehen. In der Abbildung sieht man zum Vergleich das entsprechende vereinfachte 3D-Chromatogramm

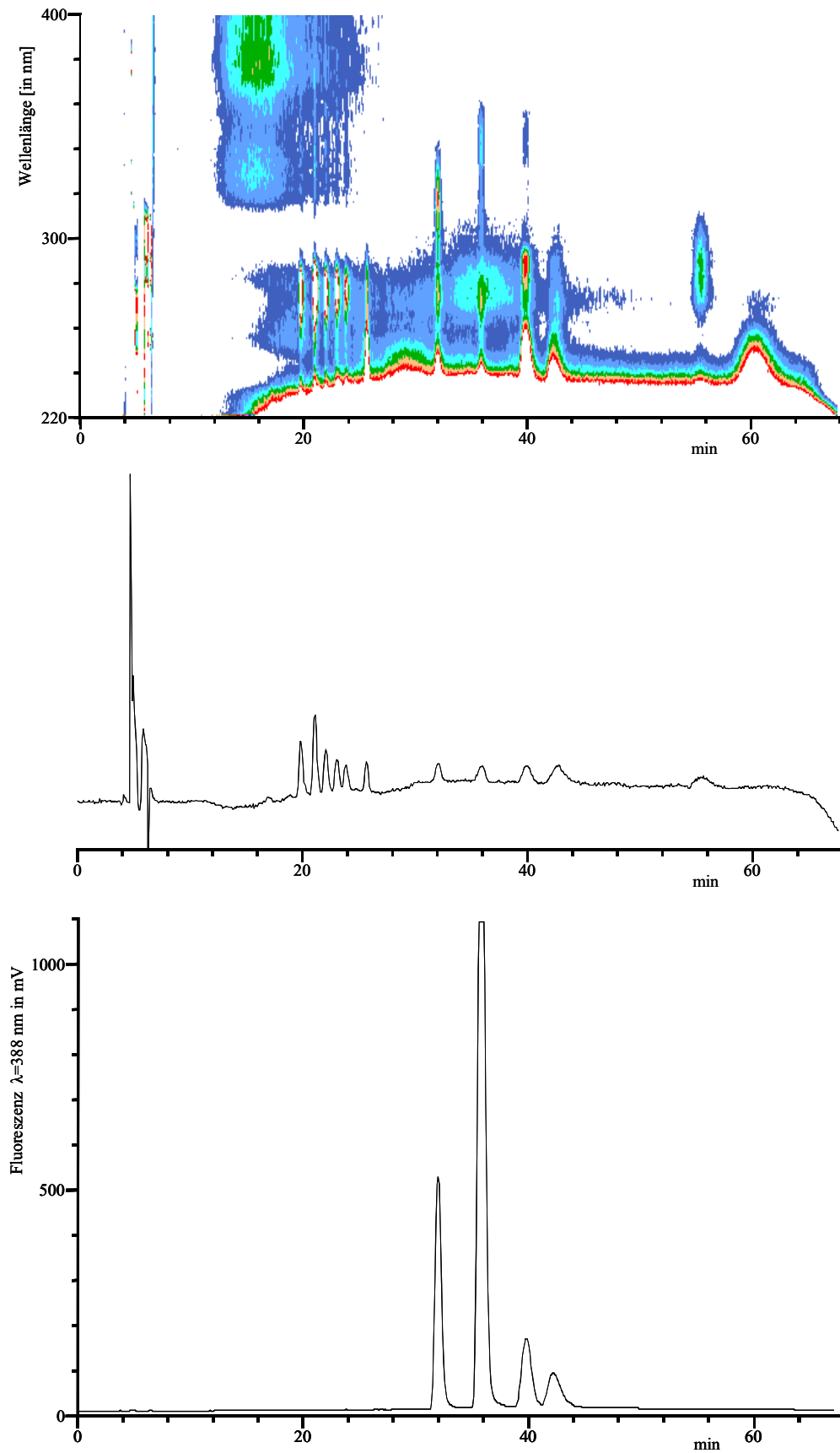
und das Chromatogramm bei  $\lambda = 265$  nm. Um in einem für die Intensität der Fluoreszenz optimalen Bereich zu arbeiten, muss der pH-Wert des TEAP-Puffers auf 7 eingestellt werden. Die Selektivität und Empfindlichkeit hinsichtlich des Nachweises und der Bestimmung der fluoreszierenden Verbindungen wird dadurch gesteigert. Die Peaksymmetrie sowie die Trennschärfe verschlechtern sich aber allgemein.

Die spektralen Untergrundstörungen nehmen zu. Bei einer üblichen gewählten Anregungswellenlänge von  $\lambda = 333$  nm [Lit. 75, 76, 287] und einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 388$  nm können mit dem in den eigenen Arbeiten benutzten Fluoreszenz-Detektor lediglich PhIP, MeA $\alpha$ C, Harman und Norharman detektiert werden. Gegenüber der DAD-Detektion ist die Nachweisgrenze für diese Verbindungen um eine Zehnerpotenz niedriger (vgl. Trennung eines PhIP-Standards in Abb. 2.9).

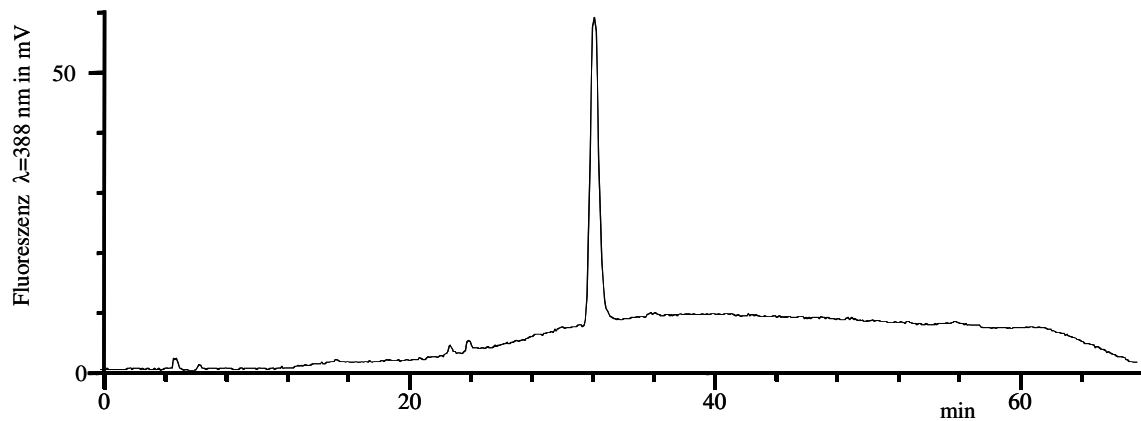
Da nur eine begrenzte Zahl von Analyten durch eine Fluoreszenz-Detektion erfasst werden kann, eignete sich die Kombination eines HPLC-Trennsystems mit einem Fluoreszenz-Detektor nur für spezielle Aufgabenstellungen.

### III. Elektrochemische Detektion

Eine Alternative zur DAD- bzw. zur fluorimetrischen Detektion ist die elektrochemische Detektion (ELCD). Je nach verwendetem Detektortyp unterscheidet man zwischen einer coulometrischen oder amperometrischen Detektion. Das Grundprinzip eines elektrochemischen Detektors basiert auf der Oxidation oder Reduktion des Analyten durch Anlegen eines Spannungspotentials. Messgröße ist der bei der Umsetzung fließende Strom. Bei einem amperometrischen Detektor hat man eine konstante Umsetzungsrate je nach Detektorzellentyp von 5 % bis 10 %. Bei einem coulometrischen Detektor erreicht man durch die Vergrößerung der Elektrodenoberfläche eine Umsetzungsrate von 100 %. An der schematisch dargestellten Detektorzelle eines amperometrischen Detektors in Abb. 2.10 kann man deren Grundaufbau, bestehend aus drei Elektroden, erkennen. Die Umsetzung erfolgt an einer Arbeitselektrode, die meist aus vergoldetem Edelstahl oder aus Platin besteht. Bei coulometrischen Detektoren besteht die Arbeitselektrode aus porösem Graphit. Zwischen der Arbeitselektrode und einer Referenzelektrode (Ag/AgCl oder Hg/Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) kann ein Potential von -1,2 bis +1,4 V eingestellt werden. Unterhalb dieses wählbaren Potentialbereiches findet eine Zersetzung von Wasser in H<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> statt, oberhalb dieses Bereiches erfolgt eine Oxidation des gelösten O<sub>2</sub>. Damit die Referenzelektrode durch die bei der Umsetzung fließenden Ströme nicht beeinflusst wird, werden diese über eine so genannte Gegenelektrode abgeführt.

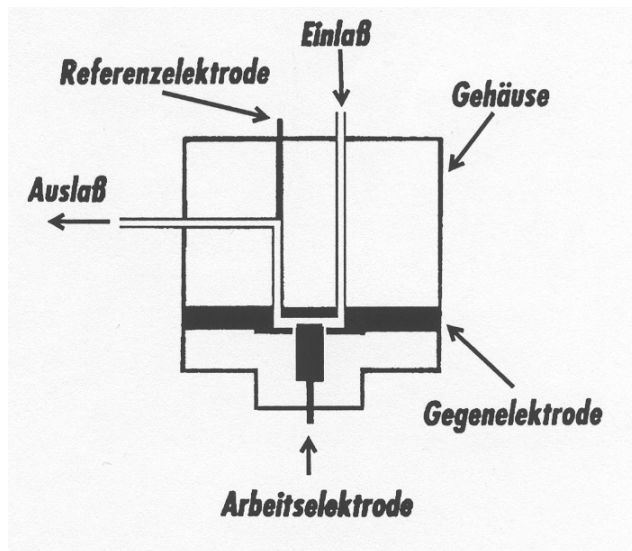
**Abbildung 2.8**

Vergleich zwischen DAD- und fluorimetrischer Detektion: vereinfachtes 3D-Chromatogramm (oben), Chromatogramm DAD bei  $\lambda = 265$  nm (mitte) und Chromatogramm fluorimetrische Detektion bei Anregung  $\lambda = 333$  nm und Emmission bei  $\lambda = 388$  nm (unten) eines HAA-Standardgemisches  $0,8 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ; Elutionsreihenfolge und Trennparameter vgl. Abb. 2.2.



**Abbildung 2.9**

Chromatogramm fluorimetrische Detektion bei Anregung  $\lambda=333$  nm und Emission bei  $\lambda=388$  nm (unten) eines PhIP-Einzelstandards  $0,04$  ng/ $\mu$ l; Elutionsreihenfolge und Trennparameter vgl. Abb. 2.2.



**Abbildung 2.10**

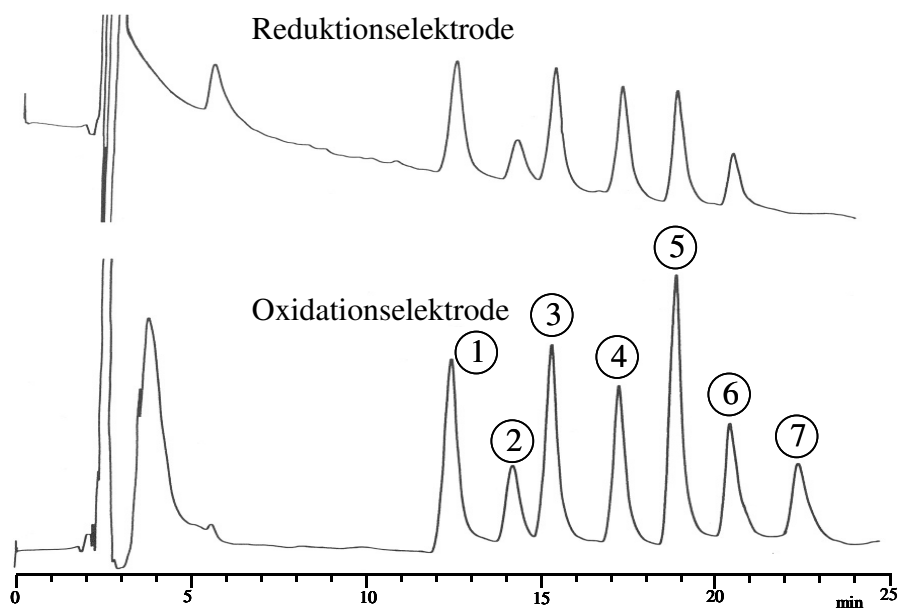
Schematische Darstellung einer Detektorzelle eines amperometrischen Detektors, Fa. Varian

Die Empfindlichkeit von coulometrischen Detektoren ist trotz des höheren Umsatzes nicht größer als bei amperometrischen Detektoren. Mit höherem Umsatz wird auch das unspezifische Untergrundsignal verstärkt. Der Vorteil von amperometrischen Detektoren ist eine höhere Praktikabilität in der Handhabung. Coulometrische Messzellen bauen einen erhöhten Gegendruck auf und lassen sich nur schwer reinigen. Der Vorteil von coulometrischen Detektoren ist die Möglichkeit einer zusätzlichen Detektion durch eine zweite nachgeschaltete Messzelle. Verbindungen, die ein reversibles Redoxsystem bilden, können in einer ersten Messzelle oxidiert und in einer nachgeschalteten Messzelle reduziert werden. Viele Begleitsubstanzen werden bei dieser Messanordnung in der ersten Messzelle irreversibel oxidiert und in der zweiten Messzelle, in der ein negatives Potential angelegt ist, nicht mehr reduziert und somit auch nicht detektiert. Somit ergibt sich eine gesteigerte Selektivität. Aus dem substanzspezifischen Peakflächenverhältnis kann man einen substanzspezifischen Quotienten bilden, der zur



Identifizierung genutzt werden kann. Ein großer Nachteil beider Detektionsvarianten ist die Einschränkung der vorgeschalteten HPLC-Trennung. Nicht jedes Laufmittel und nicht jeder Laufmittelgradient eignet sich für die elektrochemische Detektion. Zusätze wie Triethylamin oder Diethylamin, die dem Laufmittelgemisch häufig als so genannte „Modifier“ zugesetzt werden, um die Peakschärfe zu erhöhen, müssen in ihrer Menge reduziert werden. Ansonsten würde sich ein zu hohes Untergrundrauschen ergeben. Bei einer Gradientelution kann es vorkommen, dass die Basislinie je nach gewähltem Messmodus stark driftet.

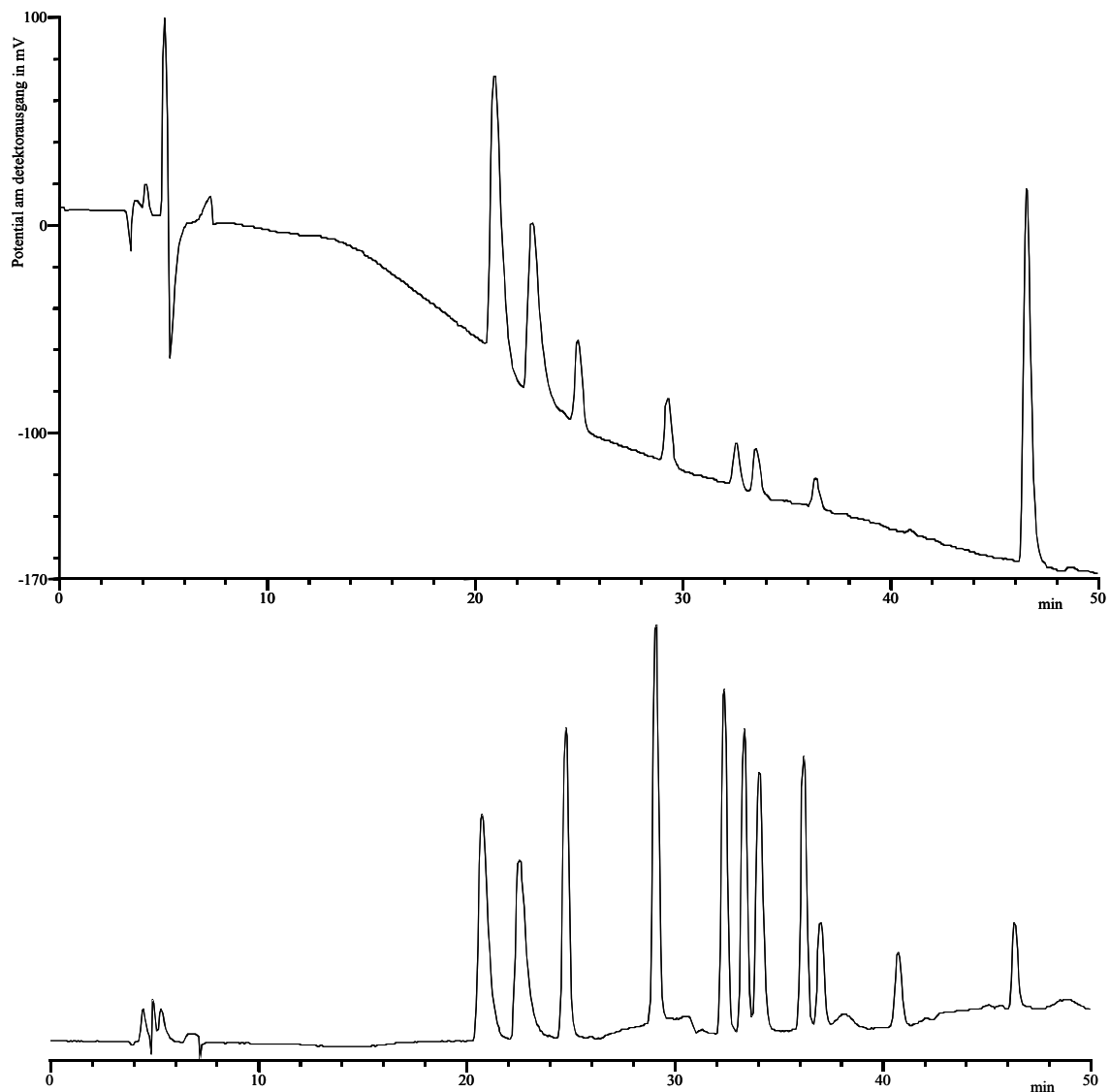
In der HAA-Analytik wird die HPLC sowohl in Kombination mit der amperometrischen Detektion [Lit. 64, 73, 110, 249, 281] als auch mit der coulometrischen Detektion [Lit. 28] eingesetzt. Ein Reduktions- und Oxidationschromatogramm aus den Arbeiten von Nutt [Lit. 213], die die coulometrische Detektion zur routinemäßigen Bestimmung von HAAs aus Reaktionsaromen anwendete, ist in Abbildung 2.11 zu sehen.



**Abbildung 2.11**

Oxidations- (unten) und Reduktionschromatogramm (oben) eines HAA-Standardgemisches; Chromatographische Bedingungen vgl. Lit. 213; Detektion mit coulometrische Detektor Fa. esa im Redox-Modus; Elektrode A: +0,65 V; Elektrode B: -0,40 V; Elutionsreihenfolge: IQ (1), MeIQ (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), 4,8-DiMeIQx (5), 4,7,8-TriMeIQx (6), PhIP (7); Quelle: Dissertation Nutt [Lit. 213].

Ein Chromatogramm der in eigenen Arbeiten durchgeführten Trennung eines HAA-Standardgemisches mit anschließender amperometrischer Detektion ist in Abbildung 2.12 (oben) dargestellt. Laufmittel und Gradient wurden auf diese Trennung hin optimiert. Dennoch zeigt sich reproduzierbar ein Driften der Basislinie. Der amperometrische Detektor war einem DAD nachgeschaltet. Anhand des mit einer Detektionswellenlänge  $\lambda$  von 265 nm vom DAD aufgenommenen Chromatogramms ist diese Trennung als nicht optimal einzustufen (vgl. Abb. 2.12, unten). Ein Driften der Basislinie könnte durch einen nahezu isokratischen HPLC-Lauf vermieden werden; mit einem isokratischen Eluenten bewirkt man eine starke Peakverbreiterung sowie eine Verlängerung der Analysenzeit. Beides ist jedoch nicht erwünscht. Mit dem Einzug der Kopplung zwischen HPLC und massenspektrometrischem Detektor ist die Verwendung elektrochemischer Detektoren zurückgedrängt worden.



**Abbildung 2.12**

Vergleich zwischen elektrochemischer und DAD-Detektion: Chromatogramm mit amperometrischer Detektion (+0,65 V, 50  $\mu$ A, oben); Chromatogramm mit DAD bei  $\lambda=265$  nm (unten) eines HAA-Standardgemisches; Elutionsreihenfolge und Trennparameter vgl. 6.8.1.5.

#### IV. HPLC/MS-Kopplung über Interfaces

Eine Trennung mittels HPLC mit anschließender massenspektrometrischer Detektion wird seit einigen Jahren als Bestimmungsmethode der Wahl für HAAs angesehen. Zahlreiche Arbeiten wie die von Richling [Lit. 235, 233] und Toribio et al. [Lit. 292, 293] beschreiben eine umfangreiche Methodenentwicklung. In den vergangenen Jahren ist die LC-MS-Kopplung über so genannte Interfaces stetig verbessert worden. In den Interfaces wird zum einen das als Eluat mit gelösten Analyten am Ende der HPLC-Säule austretende Laufmittel entfernt, zum anderen werden die zu analysierenden Verbindungen ionisiert. Die am häufigsten verwendeten Kopplungs-Interfaces in der HPLC-MS-Analytik von HAAs sind das Thermospray (TSI)-, das Elektrospray (ESI)- oder das „atmospheric pressure chemical ionisation“ (APCI)-Interface. Die Bezeichnung der Interfaces wird im Sprachgebrauch synonym zu der entsprechenden Ionisierungstechnik gebraucht.

Im Jahr 1986 wurden IQ und MeIQx erstmalig von Edmonds et al. [Lit. 39] in gekochten Lebensmitteln durch HPLC-TSI-MS unter Zuhilfenahme der Isotopenverdünnungsanalyse (vgl. Ausführungen in Kapitel 2.3.5.5) bestimmt. In den folgenden Jahren wurde die HPLC-TSI-MS-Analytik zur Erfassung von IQ, MeIQ, MeIQx, Trp-P-1 und Trp-P-2 in gekochtem Fleisch, Fleischextrakt und Tryptophanpyrolysaten angewandt (vgl. Turesky et al., 1988, [Lit. 297]; Gross et al., 1993, [Lit. 76]). Die Autoren konnten keine starke Fragmentierung von entstehenden Quasi-Molekülonen ( $[M+H]^+$ ) und Ammoniumaddukten ( $[M+NH_4]^+$ ) beobachten, weshalb die Aufnahme der Messung im so genannten „single ion monitoring“ (SIM)-Modus erfolgte. Matrixbestandteile konnten so weitgehend ausgeblendet werden, so dass eine Nachweisgrenze von unter 0,1 ng/g Probe erzielt werden konnte.

Erste HPLC-ESI-MS-Messungen wurden von Johansson et al. [Lit. 117] bei der Charakterisierung von HAAs in Modellsystemen und von Stillwell et al. [Lit. 275] im Bereich der Analytik von Metaboliten von PhIP und MeIQx im Urin von Ratten im Jahr 1995 publiziert. Die Arbeiten von Galceran [Lit. 63], in denen u. a. die simultane Bestimmung von fünf HAAs im SIM-Modus beschrieben wird, stellen zum ersten Mal anhand umfangreicher Applikationen den Nutzen und damit verbunden die Möglichkeiten der HPLC-ESI-MS im Bereich der HAA-Analytik dar. Dies erkennend wurden von zahlreichen Autoren verschiedene HPLC-ESI-MS-Applikationen beschrieben. So waren Fleisch- und Fleischextrakte ein Untersuchungsschwerpunkt der Arbeiten von Fay et al. [Lit. 50]. Salmon et al. [Lit. 240] nutzten diese Technik, um den Einfluss von Marinaden auf die Bildung von HAAs in gegrilltem Hähnchenfleisch näher zu untersuchen. Mit der Etablierung der Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) erweiterten sich die Möglichkeiten hinsichtlich Selektivität und Empfindlichkeit bei der Bestimmung der

HAAs nochmals. So konnten Malfatti et al. [Lit. 167] PhIP-Metabolite im Urin und im Blutplasma von Menschen nachweisen und exakt bestimmen. Richling et al. [Lit. 233] optimierten diese Trenntechnik, so dass Nachweisgrenzen von 0,01-0,05 ng/g Fleisch- oder Fischmatrix erreicht wurden. Mit der HPLC-ESI-MS/MS kann also die Nachweisgrenze um den Faktor 10 im Vergleich zur HPLC-ESI-MS gesenkt werden.

Andere Arbeitsgruppen ziehen das APCI-Interface zur HPLC-MS/MS-Analytik von HAAs vor. Doerge et al. [Lit. 36] verwendeten diese Technik, um IQ, MeIQx, PhIP und A $\alpha$ C in Fleischproben zu analysieren. Bei der APCI-Ionisierung ergibt sich ein stärkeres Fragmentierungsverhalten als bei der ESI-Ionisierung. Auch das vermehrte Auftreten eines Natriumadduktes ( $[M+Na]^+$ ) kann beobachtet werden.

In den eigenen Arbeiten wird ausschließlich eine ESI-Kopplung von HPLC und mehrdimensionalen Massenspektrometern verwendet. Eine spezielle Beschreibung der einzelnen Bauteile der Massenspektrometer sowie eine detaillierte Methodenentwicklung ist in Kapitel 2.3.6 beschrieben.

Mit der stetigen technischen Entwicklung werden HPLC-MS/MS-Bestimmungsmethoden zur Analytik von HAAs stetig hinsichtlich der Nachweisgrenze und der Präzision verbessert. Zusätzlich wird diese Analysetechnik durch sinkende Preise für entsprechende Massenspektrometer einem breiteren Anwenderspektrum zugänglich. Die Entwicklung einer derartigen Bestimmungsmethode nimmt sehr viel Zeit in Anspruch, da zahlreiche Parameter optimiert werden müssen. Kleine technische Störungen im Massenspektrometer manifestieren sich häufig in einer mäßigen Reproduzierbarkeit. Dies soll nicht darüber hinwegtäuschen, dass eine derart niedrige Nachweisgrenze und die Möglichkeit, durch charakteristische Massenübergänge den Analyten gleichzeitig sicher zu identifizieren, diese Messanordnung in Kombination mit einem optimierten HPLC-Lauf zukünftig zur Methode der Wahl machen werden.

### **2.3.5.5 Möglichkeiten der quantitativen Bestimmung mittels HPLC**

Unter Zugabe eines internen Standards, der vor der eigentlichen Extraktion der Probe zugefügt wird, lässt sich die Konzentration des Analyten unabhängig von dessen Wiederfindungsrate nach der Extraktion, Isolierung und Aufreinigung bestimmen [Lit. 77]. HAAs lassen sich, wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, in mehrere strukturelle Untergruppen einteilen. Bei der Verwendung nur eines inneren Standards wie z. B. 4,7,8-TriMeIQx, der zu der Gruppe der Chinoxaline zählt, läuft man Gefahr, dass sich davon strukturell unterscheidende HAAs

wie die Aminocarboline mit einer anderen Wiederfindungsrate extrahiert und isoliert werden. Die Bestimmung verliert dadurch an Präzision.

Mithilfe des Standardadditionsverfahrens lassen sich individuelle Wiederfindungsraten für jeden Analyten berücksichtigen. Ein Berechnungsverfahren unter Nutzung der linearen Regression mit der zugegebenen Menge an Referenz als abhängige Variable  $x$  und der gemessenen Konzentration als unabhängige Variable  $y$  ermöglicht eine genaue Bestimmung der für jedes HAA individuellen Wiederfindungsrate. Je nachdem, wie weit die Wiederfindungsraten für eine spezielle Analysenmethode voneinander abweichen, sind ein oder mehrere innere Standards einzusetzen. Einen Überblick über die quantitative Auswertung mithilfe des Standardadditionsverfahrens sowie eine Hilfestellung bei der Berechnung gibt der vielzitierte Übersichtsartikel von Renman und Jagner [Lit. 231].

Bei der Analyse aufgearbeiteter Isolate mittels HPLC-MS oder GC-MS besteht noch die Möglichkeit einer Bestimmung über die Stabilisotopen-Verdünnungsanalyse (IVA) nach Heumann [Lit. 91], da heute isotopenmarkierte Standards vieler HAAs verfügbar sind. In ihren Arbeiten beschreibt Richling [Lit. 235] detailliert die Anwendung der IVA bei der Bestimmung von PhIP in Reaktionsaromen des Maillard-Typs mittels HPLC-ESI-MS/MS.

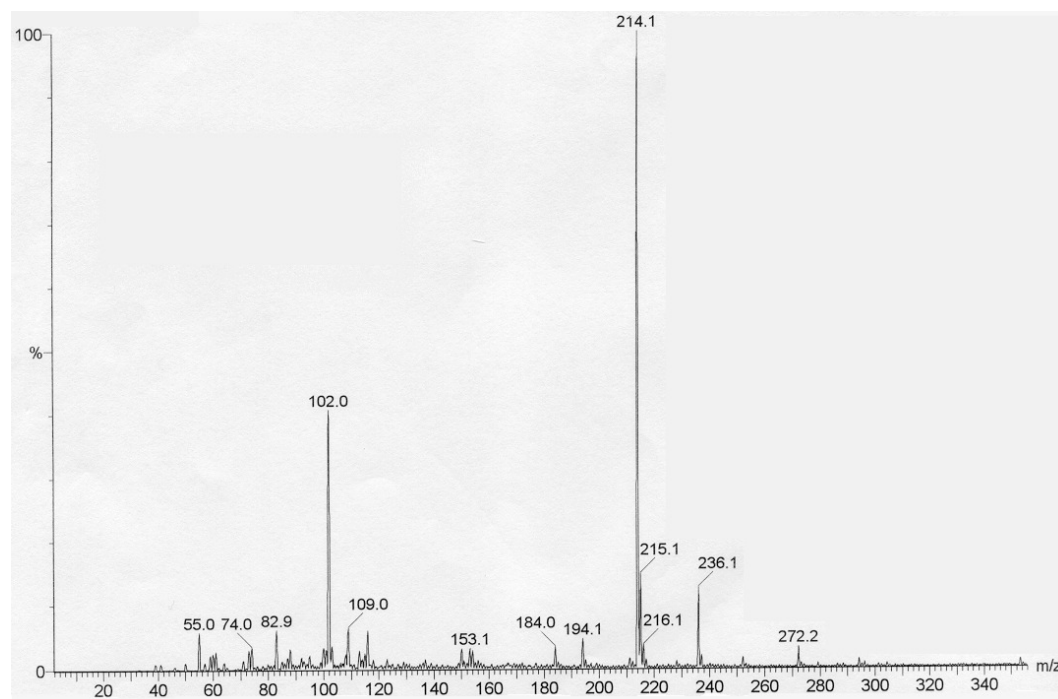
Ein isotopenmarkierter Standard ist im Hinblick auf die Theorie der ideale Standard, da er sich physikalisch und chemisch nahezu identisch zu der zu untersuchenden Substanz verhält. Die Siedepunkte, Dampfdrücke, die NERNST'schen Verteilungskoeffizienten, die chromatographischen Eigenschaften sowie die chemische Reaktivität und Stabilität sind identisch. So wird der isotopenmarkierte Standard, der bereits zu Anfang der aufzuarbeitenden Probe unter Beachtung einer homogenen Verteilung zugesetzt wird, gegenüber dem Analyten – und umgekehrt – nicht diskriminiert. Das sich einstellende Analyt/Isotopenstandardverhältnis bleibt durch alle Aufarbeitungsschritte hindurch konstant.

#### **2.3.5.6 Nutzung des charakteristischen Fragmentierungsverhaltens nach Stoßionisation für die Bestimmung von HAAs mittels HPLC-MS/MS**

Durch ständig sinkende Preise bei gleichzeitiger Weiterentwicklung und Miniaturisierung halten immer mehr HPLC-MS/MS-Systeme Einzug in Forschungs- und Routinelaboratorien. Um die Möglichkeiten des jeweiligen Gerätes auszunutzen, sind die entsprechenden Geräteparameter besonders im Hinblick auf ein aussagekräftiges charakteristisches Fragmentierungsverhalten nach definierter Stoßionisation zu optimieren. In den eigenen Arbeiten wurde in Zusammenarbeit mit Christophe Goldbeck [Lit. 69] und Dr. Thorsten Bernsmann, Chemisches Landes- und Staatliches Veterinäruntersuchungsamt Münster, eine HPLC-MS/MS-

Methode für die Bestimmung von HAAs entwickelt, optimiert und validiert (vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.8.2.2).

Um geeignete Ionisierungsparameter für die zu analysierenden HAAs zu ermitteln, wurden zunächst HAA-Einzelstandards mit der Nanospray-ESI-MS<sup>1</sup> im Produktionenscan-Modus vermessen. Wie aus Abbildung 2.13 für MeIQx und aus Abbildung 2.14 für 4,7,8-TriMeIQx ersichtlich, lassen sich unter den schonenden Bedingungen der Elektronenspray-Ionisation die Analyten leicht in Ionen überführen.

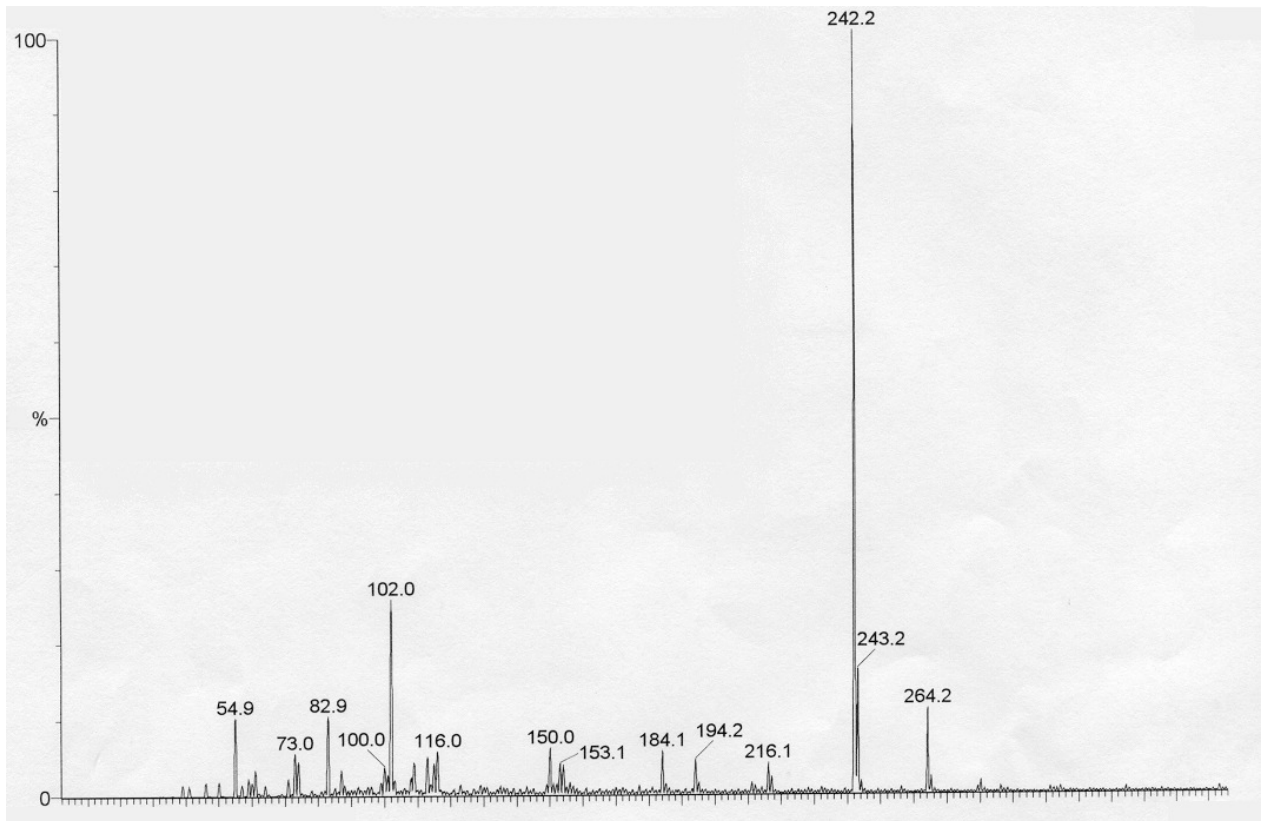


**Abbildung 2.13**

ES-Massenspektrum von MeIQx (M=213) gemessen auf dem QUATTRO LCZ (Waters-Micromass, Manchester, UK) mit Nanosprayeinlass; Kapillarspannung 0,94 kV, HV Lens 0,2 kV, Cone 20 V, Skimmer Lens 2 V

Alle HAAs lieferten im positiven Modus intensive sogenannte Quasimolekülonen ( $[M+H]^+$ ), die durch Protonierung entstanden sind. Daneben können noch  $[M+Na]^+$ -Addukte und mit sehr schwacher Intensität  $[M+K]^+$ -Addukte nachgewiesen werden. Es konnten zwar noch weitere Massenfragmente detektiert werden. Diese sind aber in allen Standardproben nachweisbar, so dass davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um Verunreinigungen handelt. Es ist möglich, die einzelnen HAAs im SIM-Modus zu detektieren.

<sup>1</sup> Westfälische Wilhelms-Universität, Institut für Organische Chemie, Abt. Massenspektrometrie/Herr Dr. Luftmann

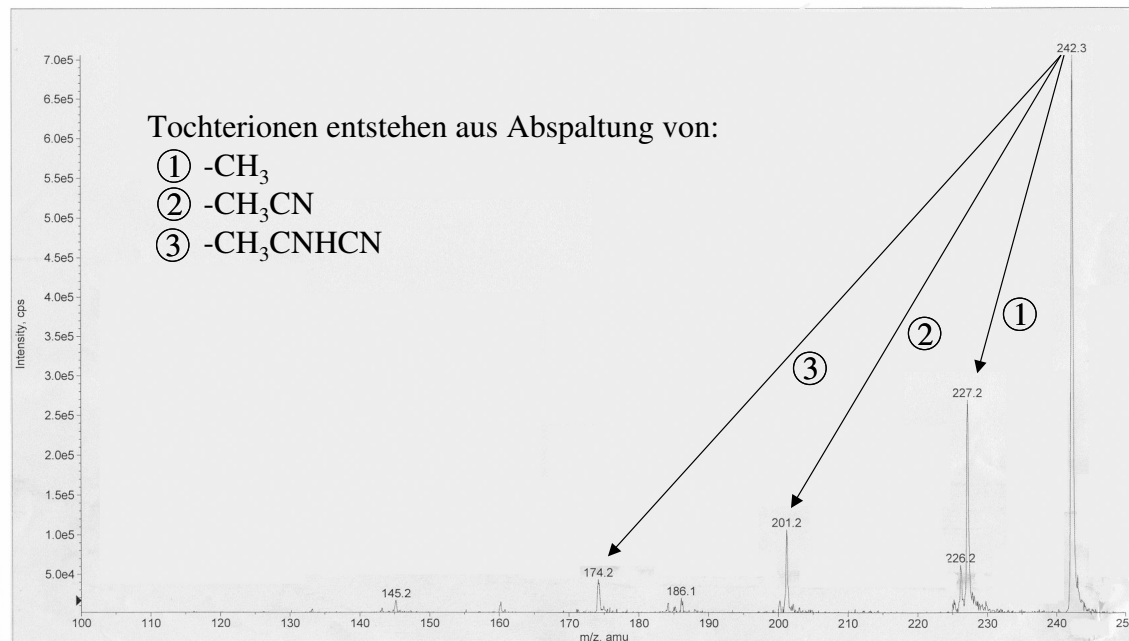


**Abbildung 2.14**

ES-Massenspektrum von 4,7,8-TriMeIQ<sub>x</sub> (M=241) gemessen auf dem QUATTRO LCZ (Waters-Micromass, Manchester, UK) mit Nanosprayeinlass; Kapillarspannung 0,94 kV, HV Lens 0,2 kV, Cone 20 V, Skimmer Lens 2 V

Für die Bestimmung über die HPLC-MS/MS wird in letzter Zeit ausschließlich der „Selected Reaction Monitoring“ (SRM)-Modus genutzt. Dabei wird neben dem Prekursor-Ion auch das für die Verbindung charakteristische Produkt-Ion benötigt. In den eigenen Arbeiten wurden die charakteristischen Produkt-Ionen (Tochter-Ionen) durch so genannte „kollisionsinduzierte Dissozierung“ (CID) aus den jeweiligen Molekül-Ionen ( $[M+H]^+$ ) (Eltern- oder Prekursor-Ionen) erzeugt. In Abbildung 2.15 ist ein Produkt-Ionenspektrum von 4,7,8-TriMeIQ<sub>x</sub> zu sehen. Hierzu ist anzumerken, dass diese Messung mit einem 4000 Q Trap<sup>TM</sup>-Massenspektrometer aufgenommen wurde. Bei diesem Gerät ist der letzte Quadrupol so konstruiert, dass er zusammen mit dem SEV als eine Ionenfalle (Trap) arbeiten kann. Fragment-Ionen, die durch unterschiedliche in ms-Abständen nacheinander in der Kollisionszelle des Gerätes ablaufende Stoßexperimente entstehen, können so gespeichert und gemeinsam mit den zum Teil noch unfragmentierten Eltern-Ionen detektiert werden. Der große Vorteil einer Ionenfalle liegt darin, dass nahezu alle Ionen detektiert werden. Die Empfindlichkeit kann dadurch erheblich gesteigert werden.

Das dominierende Produkt-Ion mit  $m/z = 227$  entsteht durch den Verlust von einer Methylgruppe ( $-CH_3$ ) am protonierten Molekül-Ion. Weitere Produkt-Ionen, mit  $m/z = 201$  und  $m/z = 174$ , entstehen aus dem Verlust einer Aminoimidazol-Gruppe ( $-CH_3CN$ ,  $CH_3HCN$ ).



**Abbildung 2.15**

ES-Massenspektrum von 4,7,8-TriMeIQx (M=241) gemessen auf dem 4000 Q Trap<sup>TM</sup>-Massenspektrometer (Fa. Applied Biosystems, Deutschland); Kapillarspannung Positive Enhanced Product Ion, Scan-Mass 100 – 250, Step 0,1, Collision Energy 39

Die Verbindungen IQ, IQx, MeIQ, 4,8- und 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx und PhIP in Form ihrer Quasimolekül-Ionen  $[M+H]^+$  zerfallen unter den gewählten Ionisierungs- und Kollisionsbedingungen ebenfalls in die beschriebenen drei markanten Tochter-Ionen (-15, -41 und -68 Masseneinheiten). Die Tochter-Ionen konnten durch weitere Stoßexperimente nicht weiter fragmentiert werden, sodass sogenannte MS<sup>3</sup>-Messungen nicht möglich waren.

Mit dem in den eigenen Arbeiten routinemäßig genutzten QuattroLC<sup>TM</sup>-Massenspektrometer wurde zur Entwicklung einer geeigneten Detektionsmethode zunächst mit den zu analysierenden HAAs getunt. Hierbei werden die entsprechenden Parameter der „Cone-Voltage“ und „Collision-Energy“ für den Übergang des jeweiligen Eltern-Ions in zwei Tochter-Ionen für jedes HAA optimiert. Tabelle 2.1 zeigt die jeweils optimierten Einstellungen für die jeweiligen Massenübergänge zu den einzelnen Tochter-Ionen.

Für den Analysenlauf im Single-Reaction-Monitoring (SRM)-Modus wird für jedes zu bestimmende HAA eine Konfiguration des Interfaces (Cone-Voltage zur Gewährleistung des quantitativen Eintritts der Eltern-Ionen in das Massenspektrometer), des ersten Quadrupols (Massenfilter für das jeweilige Eltern-Ion), der Kollisionszelle (Collision-Energy zur definierten Erzeugung von Tochterionen) sowie des dritten Quadrupols und der Detektoreinheit (Detektion des spezifischen Tochter-Ions) festgelegt.



Analyt	Übergang	Collision-Energy (eV)	Cone Voltage (V)
IQ	199,2 >157,1	37	45
	199,2 >184,1	27	45
IQx	200,3 >159,2	20	45
	200,3 >185,2	29	45
MeIQ	213,4 >145,1	27	45
	213,4 >198,2	27	45
MeIQx	214,4 >173,0	24	45
	214,4 >199,3	28	45
4,8-DiMeIQx u. 7,8-DiMeIQx	228,4 >160,2	30	40
	228,4 >213,3	26	40
4,7,8-TriMeIQx	242,2 >145,0	40	50
	242,2 >227,2	30	50
Norharman	169,0 >115,0	50	35
	169,0 >140,0	35	35
Harman	183,3 >115,0	34	50
	183,3 >168,2	28	50
PhIP	225,4 >140,2	56	48
	225,4 >210,0	29	48
MeA $\alpha$ C	198,4 >181,2	23	40
	198,4 >183,2	23	40

**Tabelle 2.1**

Charakteristische Massenübergänge der HAAs mit Geräteeinstellung (Collision Energy, Cone Voltage) zur Erstellung eines SRM-Experimentes

Die während der jeweiligen HPLC-MS/MS-Messungen aufgezeichneten Rohdaten können so aufgearbeitet werden, dass die einzelnen Tochterionen in so genannten Massenspuren dargestellt werden. Eine Auswertung ist – wie bei anderen chromatographischen Trennungen üblich – über die integrierte Fläche unter den entsprechenden Kurven möglich. Abbildung 2.16 zeigt die unterschiedlichen Massenspuren von (8)-MeIQx und 7,8-DiMeIQx für die beiden Töchter mit der höchsten Intensität. Die Bestimmung der HAAs mittels HPLC-MS/MS erfolgte in den eigenen Arbeiten über den inneren Standard 4,7,8-TriMeIQx. Die genaue Menge an HAAs wurde aber nicht über die Responsefaktoren direkt, sondern über eine Fünf-Punkt-Kalibrationsreihe in den jeweiligen Probelösungen bestimmt.

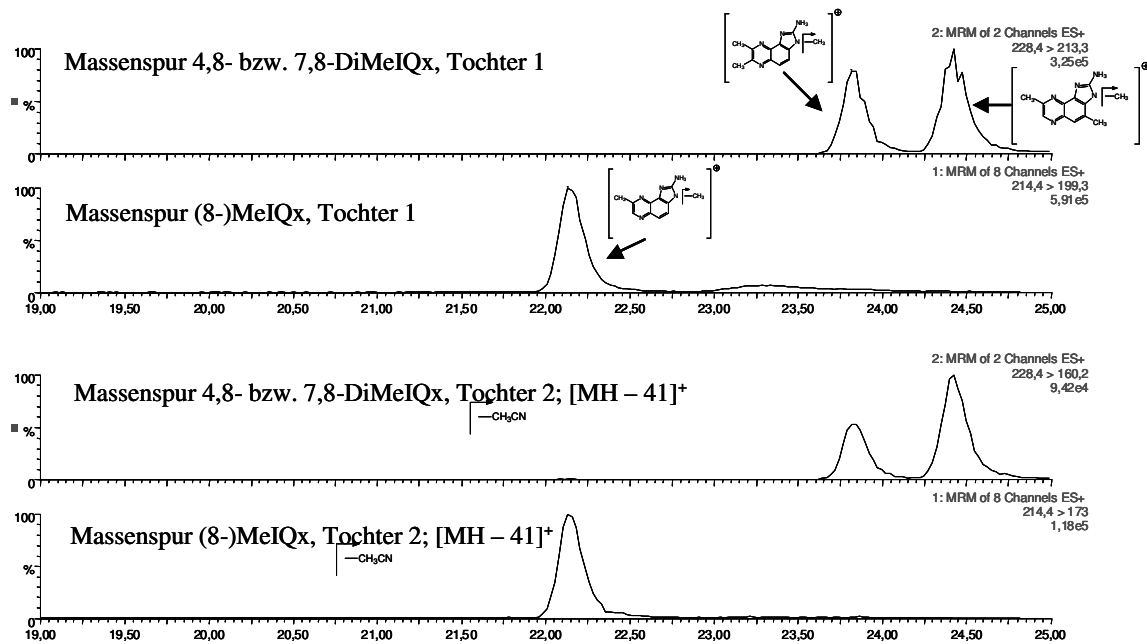


Abbildung 2.16

Ausschnitt aus einer HPLC-MS/MS-Trennung eines HAA-Standardgemisches: charakteristische Massenspektren der Tochterionen [MH-41]<sup>+</sup>, [MH-15]<sup>+</sup> von MeIQx und 4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx; Geräteeinstellungen HPLC und MS/MS vgl. 6.8.2.1; LiChrospher 100 RP-18e (4µm); 250 x 3 mm; Mobile Phase A: Ammoniumformiat-Pufferlösung (10 mM, pH 3,5); mobile Phase B: Acetonitril/Ammoniumformiat-Pufferlösung (pH 3,5) 50/50 (v/v); Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 80+20, 25 min: 0+100, 60 min: 0+100, 65 min: 80+20, 80 min: 80+20; Flussrate 0,3 ml, Injektionsvolumen 5 µl einer Standardlösung mit 0,75 ng/µl.

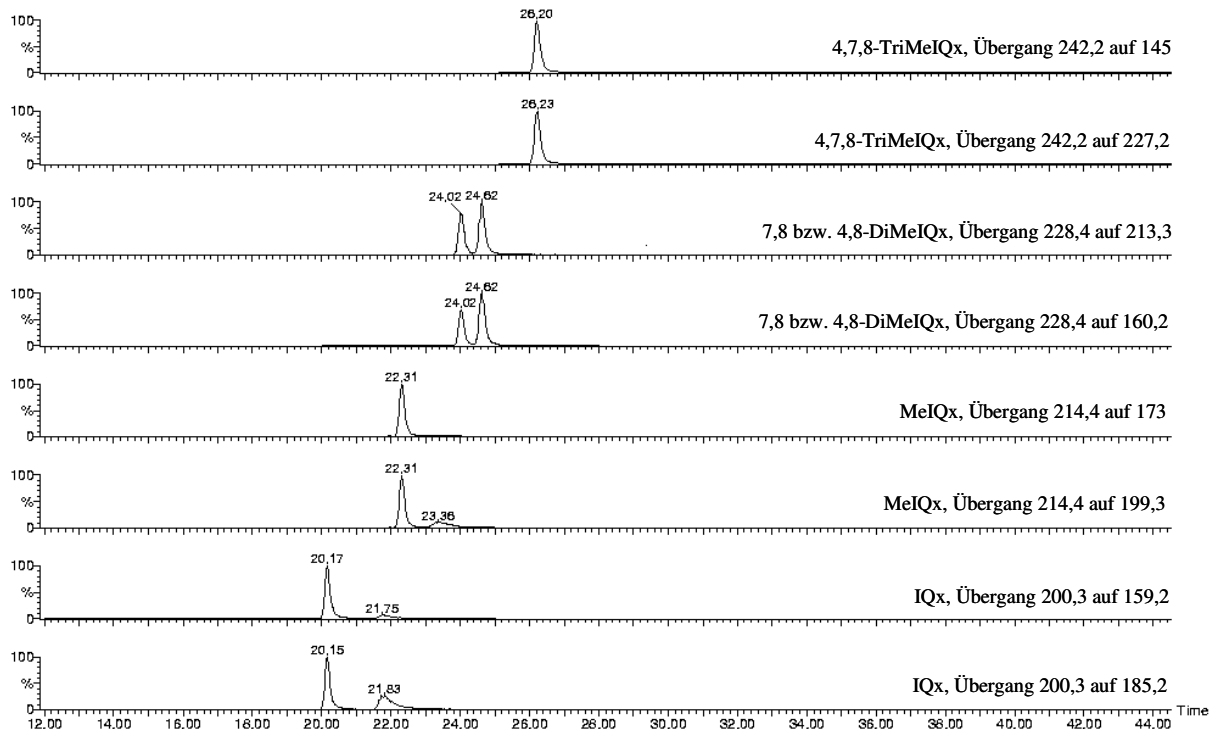
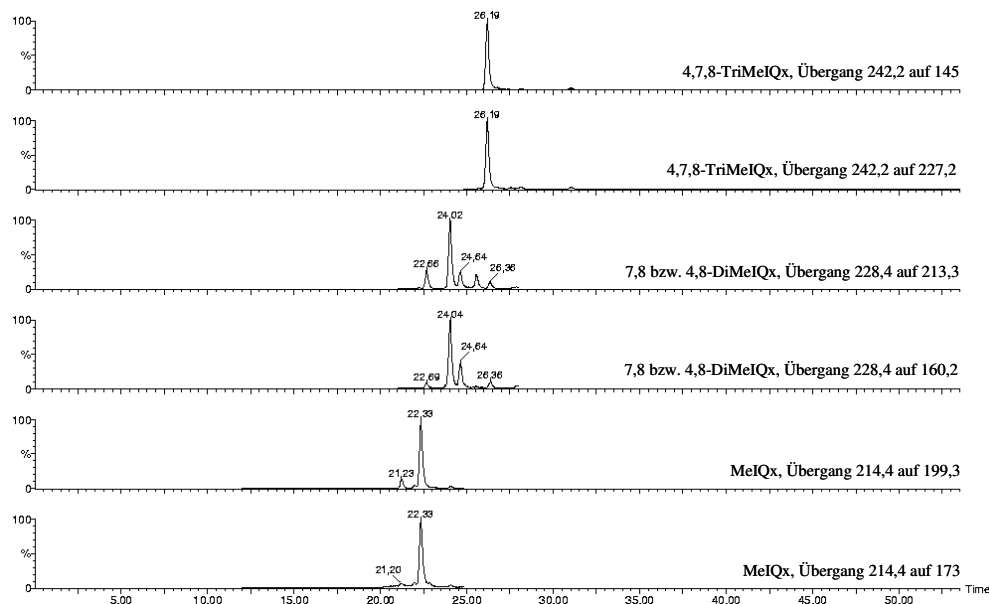


Abbildung 2.17

Ausschnitt aus einer HPLC-MS/MS-Trennung eines HAA-Standardgemisches: charakteristische Massenspektren der Tochterionen (Messparameter für die charakteristischen Übergänge vgl. Tab. 2.1); Geräteeinstellungen HPLC und MS/MS vgl. 6.8.2.1; HPLC-Trennung vgl. Abb. 2.16, Standardlösung mit 0,25 ng/µl.

Ein direkter Vergleich eines Ausschnittes aus einem HPLC-MS/MS-Lauf einer HAA-Standardmischung in Abbildung 2.17 mit einem Ausschnitt aus einem HPLC-MS/MS-Lauf eines entsprechend aufgearbeiteten (vgl. Arbeitsvorschriften 6.7.1 ff), Extraktes eines Glucose-Glycin-Kreatinin-Modellsystems in Abbildung 2.18 zeigt, dass die Matrix bei der Messung im SRM-Modus nahezu ausgeblendet wird. Dies steigert die Empfindlichkeit der Methode erheblich.



**Abbildung 2.18**

Ausschnitt aus einer HPLC-MS/MS-Trennung eines aufgearbeiteten Extraktes (vgl. 6.7) eines Xylose-Glycin-Kreatinin enthaltenden wasserarmen Avicel-Modellsystems (Zusammensetzung vgl. 6.5.3): charakteristische Massenspuren der Tochterionen (Messparameter für die charakteristischen Übergänge vgl. Tab. 2.1); Geräteeinstellungen HPLC und MS/MS vgl. 6.8.2.1; HPLC-Trennung vgl. Abb. 2.16, Zusatz von innerem Standard 4,7,8-TriMeIQx mit 200 ng/g Modellsystem.

Bei der Massenspur von 4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx fällt auf, dass in der Realprobe (Abb. 2.18) noch weitere dieser HAA-Isomere vorkommen.

Es wurden bei Realproben Nachweisgrenzen (Signal/Rausch-Verhältnis 3:1) von 1 ng HAA/ml Probenlösung und Bestimmungsgrenzen von 4 ng HAA/ml Probenlösung erzielt. Die erzielten Nachweisgrenzen für Proben im fmol-Bereich erlauben eine verlässliche Detektion der HAAs im absoluten Spurenbereich.

### 2.3.6 Gaschromatographie

Die Gaschromatographie (GC) wird neben der HPLC standardmäßig zur Trennung von HAAs genutzt. In Form der Kapillar-GC hat diese gegenüber der HPLC den Vorteil, dass sie eine höhere Trennleistung besitzt. Komplexe Stoffgemische lassen sich folglich besser über eine

GC als durch eine HPLC trennen [Lit. 307]. Eine Kopplung der GC mit einem Massenspektrometer ermöglicht außerdem konkrete Aussagen über die Struktur der getrennten Verbindungen.

### 2.3.6.1 Trennprinzip

Bei der Gaschromatographie wird die Probe am Anfang einer chromatographischen Säule im Injektorblock verdampft und mit dem Trägergasfluss auf die Säule gebracht. Das inerte Trägergas, die mobile Phase, tritt im Gegensatz zu anderen chromatographischen Verfahren nicht mit den Analyten in Wechselwirkung, sondern es stellt lediglich den Transport von diesen in der Säule sicher. Anhand der stationären Phase unterteilt man in der Gaschromatographie in die GSC (gas solid chromatography) und die GLC (gas liquid chromatography).

Die GSC basiert auf einer festen stationären Phase, an der die Retention der Analyten infolge ihrer physikalischen Adsorption am Trägermaterial erfolgt. In früherer Zeit setzte man gepackte Säulen mit Diatomeenerdenfüllung für die GCS ein, die jedoch aufgrund ihrer eingeschränkten Trennleistung heute nur noch für die Trennung bestimmter niedermolekularer Verbindungen eingesetzt werden [Lit. 270].

Die GLC beruht auf dem Prinzip der Verteilung der Analyten zwischen einer gasförmigen mobilen Phase und einer flüssigen Phase, die auf der Trennsäule als dünner Film chemisch gebunden und somit immobilisiert vorliegt (Belegung). Die Retentionszeit einer gelösten Substanz in einer Säule hängt von ihrem Verteilungsquotienten ab, der jeweils von der gewählten Belegung abhängt. Um eine Verteilung sicherzustellen, muss der zu untersuchende Analyt eine gewisse Löslichkeit in der stationären Phase aufweisen. Wenn Analyten und Belegung die gleiche Polarität aufweisen, wird die Elutionsreihenfolge der Analyten von ihren Siedepunkten bestimmt. Zum Einsatz kommen neben Kapillaren aus Edelstahl in erster Linie englumige Quarzkapillaren (fused-silica open tubular, FSOT). Die Quarzkapillaren sind von außen mit einer Polyimidschicht überzogen, die sie sehr flexibel und damit leicht handhabbar macht. Neben verschiedenen substituierten Polyethylenglykolen werden besonders flüssige, zum Teil substituierte Polydimethylsiloxane als stationäre Phasen eingesetzt.

### 2.3.6.2 Aufbau der in den eigenen Arbeiten verwendeten Trenn- und Detektorsysteme

Um reproduzierbare Mengen an Probelösung in den Injektorblock zu injizieren, wurden gasdichte GC-Injektionsspritzen verwendet und – wenn möglich – die Injektion von einem programmierbaren Autosampler vorgenommen. Die Adsorption von Probenbestandteilen an der

Oberfläche des Verdampfungsliners wurde durch regelmäßige Desaktivierung desselben (vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.2.2.2) verhindert. Es wurden grundsätzlich nur Kapillarsäulen in den GC eingebaut. Als Trägergas diente Helium bei GC-MS-Kopplungen sowie Wasserstoff in allen anderen Fällen.

#### I. GC mit Flammenionisationsdetektor (FID) und mit Elektroneneinfangdetektor (ECD)

Der bei den eigenen Arbeiten verwendete GC vom Typ Autosystem XL der Firma Perkin Elmer verfügt über einen druck- und zeitprogrammierbaren Injektor. Somit kann eine Pulsed-Split/Splitless-Injektion durchgeführt werden. Hierbei wird zunächst der Säulenvordruck während des Injektionsvorganges um ca. 20 % erhöht. Verbindungen, die leicht verdampfen, gelangen mit dem Trägergas so schnell auf die Säule, dass ein entsprechendes Splitventil bereits nach 20 Sekunden geöffnet werden kann. Der Säulenvordruck wird danach auf ein für die Trennung optimiertes Niveau gesenkt. Mäßig flüchtige und schwerflüchtige Verunreinigungen verdampfen so erst dann, wenn das Splitventil geöffnet ist. Durch den erhöhten Trägergasfluss bei geöffnetem Splitventil werden sie kontinuierlich aus dem Verdampfungsliner gespült. Durch die Einstellung eines hohen Splitverhältnisses gelangt nur ein Bruchteil dieser Verunreinigungen auf die Säule. Das chemische Rauschen kann dadurch erheblich gesenkt werden. Der verwendete GC besitzt außerdem zwei getrennt ansteuerbare Detektorbasen. Durch den Einbau eines sogenannten Y-Verbinders können die an der GC-Säule getrennten Verbindungen simultan mittels FID und ECD detektiert werden. Ein Vergleich der beiden Detektionsvarianten ist auf diese Weise möglich. Entsprechende Mess- und Steuerparameter des GC-FID-Trennsystems sind unter Kapitel 6.8.3.1 verzeichnet.

Die Steuerung des Autosamplers und des gesamten GCs sowie die Auswertung der aufgenommenen Rohdaten erfolgte über die Auswertesoftware Turbochrom (Version 6.10) der Firma Perkin Elmer.

#### II. GC gekoppelt mit einem Ionenfallenmassenspektrometer (ITD)

In den eigenen Untersuchungen wurde zur Bestimmung derivatisierter HAAs ein GC der Firma Dani mit einem temperaturprogrammierten Verdampfer (programmed temperature vaporizer, PTV) eingesetzt. Die Kopplung mit einem ITD-Massenspektrometer der Firma MAT/Finnigan erfolgte über eine beheizte Edelstahlkapillare.

Mit dem PTV-Injektor ist eine Kaltaufgabe der Probelösung möglich [Lit. 228]. Die flüssige Probe wird bei dieser Technik in einen Glasliner dosiert, welcher dann sehr schnell aufgeheizt

werden kann. Bei dem in den eigenen Untersuchungen eingesetzten PTV wurde Luft als Wärmeträger verwendet, wodurch Aufheizraten bis etwa 1000 °C/min möglich waren. Mit der GC-Steuerung lassen sich zwei Heizraten und drei Temperaturplateaus manuell programmieren. Eine Lösungsmittelausblendung, auch „solvent split“ genannt, ist so möglich. Hierzu werden größere Volumina – normalerweise ca. 5-10 µl, aber auch bis zu 100 µl – in den kalten Injektor injiziert und die Hauptmenge des Lösungsmittels bei geöffnetem Splitventil bei Temperaturen ein wenig unterhalb des Siedepunktes des entsprechenden Lösungsmittels abgedampft. Wenn die größte Menge des Lösungsmittels über das Splitventil entfernt ist, wird dieses Ventil geschlossen und die Substanzen gelangen direkt auf die Säule. Mit dieser Technik kann man aufgrund größerer Mengen injizierter Probenmengen höhere Nachweisempfindlichkeiten erreichen. Entsprechende Mess- und Steuerparameter des GC-ITD-Trennsystems sind unter Kapitel 6.8.4.1 verzeichnet.

### III. GC gekoppelt mit einem Quadrupol-Massenspektrometer

Der überwiegende Teil der GC-MS-Bestimmungen wurde mit einem Agilent 6890 GC gekoppelt mit einem Quadrupolmassenspektrometer vom Typ MSD 5973 der Firma Agilent/HP durchgeführt. Die gesamte Regelung, Steuerung und Auswertung wurde über die Chemstation-Software (Version B.1.7) der Firma HP abgewickelt.

Der verwendete GC ist mit einem druck- bzw. fluss- und temperaturprogrammierbaren Injektor ausgestattet, so dass Probelösungen ebenfalls durch eine Pulsed-Split/Splitless-Injektion auf die Kapillarsäule gebracht werden können. Über eine direkte beheizte Kopplungstransferline ist der GC mit einem Quadrupol-MSD verbunden. Die Mess- und Steuerparameter des GC-Quadrupol-MS-Trennsystems sind unter Kapitel 6.8.5.1 verzeichnet.

### 2.3.6.3 Geeignete Detektoreinheiten für die Bestimmung der HAAs mittels GC

In den eigenen Arbeiten wurden die im Folgenden beschriebenen Detektoreinheiten hinsichtlich der Anwendbarkeit und Präzision getestet und bewertet, um die für die durchgeführte Routineanalytik geeigneteste Bestimmungsmethode zu ermitteln.

#### I. GC-FID

Der Flammenionsationsdetektor ist zur Detektion silylierter Derivate prinzipiell gut geeignet. Dabei ist zu beachten, dass in der Probelösung eine ausreichende Menge einer fluorierten Verbindung vorliegt, um die Bildung von SiO<sub>2</sub> im Detektor zu vermeiden. Das aus den fluo-

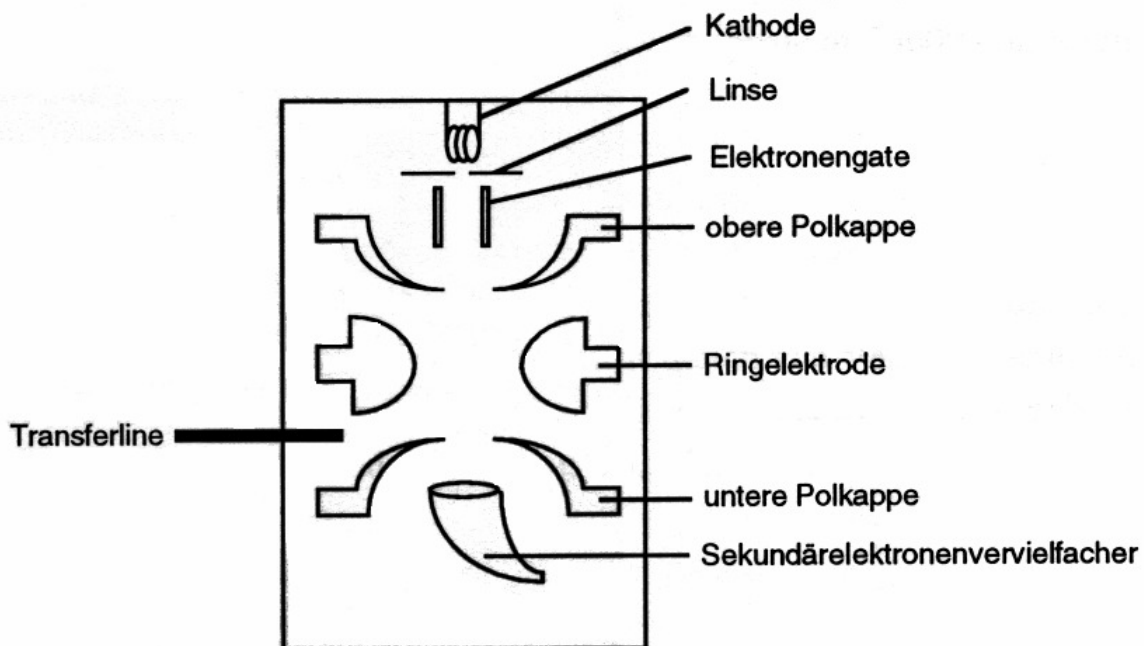
rierten Verbindungen gebildete  $\text{H}_2\text{F}_2$  sorgt dann unter den Bedingungen im Detektor dafür, dass sich flüchtiges  $\text{SiF}_2$  bildet.

## II. GC-ECD

Der ECD zeigt eine im Vergleich zum FID um mehrere Zehnerpotenzen höhere Nachweisempfindlichkeit. Allerdings muss der Analyt Gruppen tragen, die elektroneneinfangende Eigenschaften besitzen. Diese sind in erster Linie Halogenatome, wobei mit der Anzahl der Halogenatome im Molekül die Nachweisempfindlichkeit zunimmt.

## III. GC-ITD

Ein schematischer Aufbau des in den eigenen Arbeiten in Kopplung mit einem Dani-GC benutzten Ion-Trap (ITD)-Massenspektrometers ist in Abbildung 2.19 dargestellt.



**Abbildung 2.19**

Schematischer Aufbau eines Ionenfallenmassenspektrometers (Fa. Finnigan MAT)

Die vom GC über eine beheizte Transferline in den ITD gelangenden Probenmoleküle werden durch Elektronenstoßionisation (EI, 70 eV) oder durch schonendere Chemische Ionisation (CI mit Methanol, 15 eV, [GC2]) ionisiert und fragmentiert. Durch die an der Ringelektrode angelegte hochfrequente Wechselspannung (HF-Spannung) wird zwischen den drei Ion-Trap-Elektroden (obere und untere Polkappe und Ringelektrode) ein hyperbolisches elektrisches Feld erzeugt. In diesem werden Ionen in aperiodische Schwingungen versetzt und können so

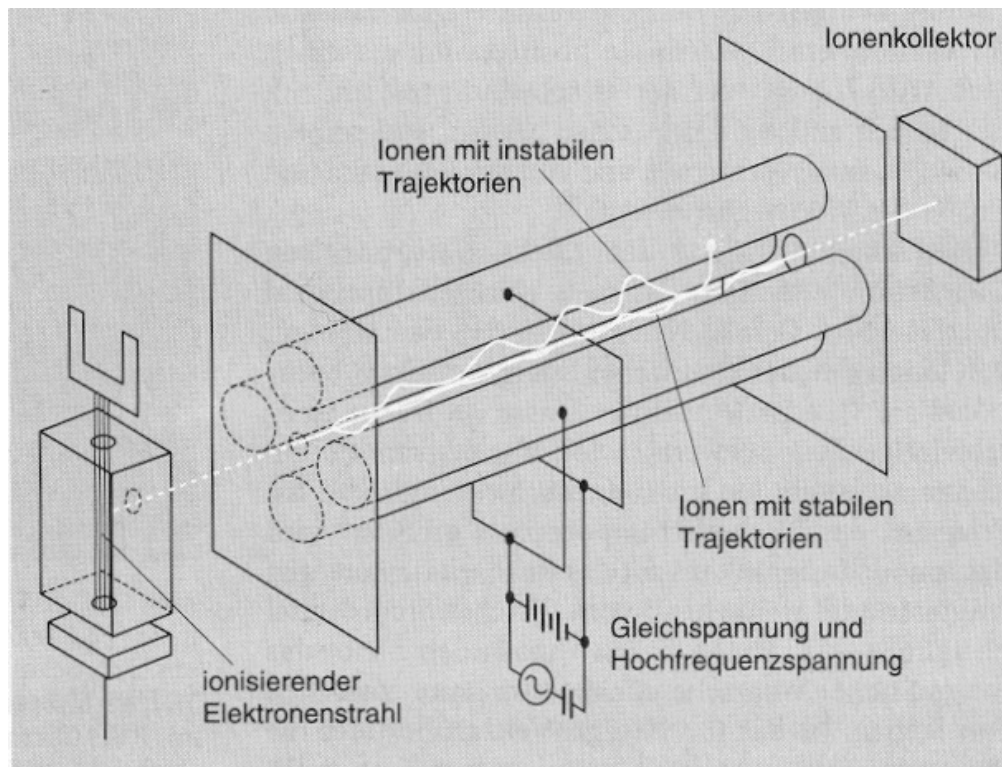
gleichsam „gespeichert“ bzw. „gefangen“ werden. Zu Beginn wird die HF-Spannung herabgesetzt, um dann während der scan-Phase durch kontinuierliche Erhöhung der Spannung den gewünschten Massenbereich abzufahren (vgl. Hübschmann [Lit. 105]). Bei einer für ein bestimmtes Masse/Ladungsverhältnis charakteristischen Spannung wird die Schwingung der jeweiligen Ionen instabil, sodass diese axial aus der Kreisumlaufbahn ausbrechen und auf einen SEV treffen, wo sie detektiert werden. Aus dem Verhältnis der Amplitudenänderung der HF-Spannung zum Multipliersignal ergibt sich das Massenspektrum der Verbindung. Um eine Überladung des Ion-Trap-Detektors zu vermeiden, wird die Ionisierungszeit in Abhängigkeit von der Menge der vorhandenen Ionen geregelt (automatic gain control, AGC).

Die Einstellung der Messparameter sowie die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die ITD-Detektor-Software (Version 4.10) der Firma MAT/Finnigan.

#### IV. GC-MSD (Quadrupol)

Das Ende der zur gaschromatographischen Trennung für die GC geeigneter Verbindungen genutzten Kapillarsäule wird durch eine beheizte Transferleitung aus dem Ofenraum des GCs direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers (siehe Abb. 2.20) geführt. In der Quelle erfahren die Analyten eine Stoßionisation mit Elektronen, die aus einem Wolfram-Glühdraht (Filament) emittiert und durch eine Spannung von +70 eV beschleunigt wurden. Durch diese so genannte „Elektronenstoßionisation“ (EI) entstehen geladene Teilchen, die durch elektrische Felder in Richtung der Längsachse eines Quadrupols (vgl. Abb. 2.20), der das Kernstück des verwendeten Massenspektrometers darstellt, geleitet werden. Ein durch ein selbstlaufendes Optimierungsverfahren (Tuning) einstellbares System von Fokussiereinheiten sorgt dafür, dass alle Ionen mit der gleichen Geschwindigkeit gradlinig in den Quadrupol eintreten. Der Ausdruck Quadrupol beschreibt die symmetrische Anordnung von vier häufig aus einer Germanium-Legierung bestehenden Stäben, die gelegentlich vergoldet sein können. Gegenüberliegende Stäbe sind elektrisch leitend miteinander verbunden. An diese Stabpaare wird eine elektrische Gleichspannung angelegt, die mit einer Wechselspannung überlagert wird. Ionen, die in Längsrichtung zwischen die Stäbe eingeführt werden, fliegen mit einer taumelnden Bewegung um die Mittelachse. Die Wechselspannung kann so gewählt werden, dass nur die Ionen innerhalb eines engen  $m/z$ -Fensters das Stabsystem vollständig passieren und dann anschließend im nachgeschalteten SEV detektiert werden. Das Quadrupol-MS wirkt damit wie ein Massenfilter.





**Abbildung 2.20**  
Schematische Darstellung eines Quadrupol-Massenspektrometers

Dieser unter konstanten Ionisierungs- und Messbedingungen ausgeführte Fragmentierungsprozess ist gut mit den theoretischen Überlegungen in Übereinstimmung zu bringen. Das jeweilige Fragmentierungsmuster kann dann zur Substanzidentifizierung herangezogen werden. Zusätzlich kann über eine Datenbankrecherche ein Vergleich mit den dort eingestellten EI-Massenspektren verschiedenster ionisierter Analyten aufgestellt werden.

Mit diesem in den eigenen Arbeiten verwendeten Massenspektrometer können auch Ionen und Fragmente aus durch GC getrennten Verbindungen detektiert und quantitativ bestimmt werden, die durch Chemische Ionisation (CI) entstanden sind. Bei der CI, die erstmalig von Munson und Field [Lit. 195] im Jahr 1966 beschrieben wurde, handelt es sich im Vergleich zur EI um ein so genanntes weiches Ionisierungsverfahren. Im Gegensatz zur EI, die als ein physikalischer Energietransfer von den Elektronen auf ein Analytmolekül zu verstehen ist, ist die CI, insbesondere die positive chemische Ionisation (PCI), als eine chemische Reaktion anzusehen [Lit. 248]. In einer Gasmischung aus Reaktandgas oder Moderatorgas (wahlweise Methan, Isobutan oder Ammoniak) wird das im Überschuss vorliegende Reaktandgas ionisiert, oder das Moderatorgas dient als Medium zur Bildung von energiewachen Elektronen. Der Analyt kann sowohl mit den Reaktandgasen als auch mit den Elektronen reagieren. Es wird zwischen Positiver Chemischer Ionisierung (PCI) und Negativer Chemischer Ionisierung (NCI) unterschieden.

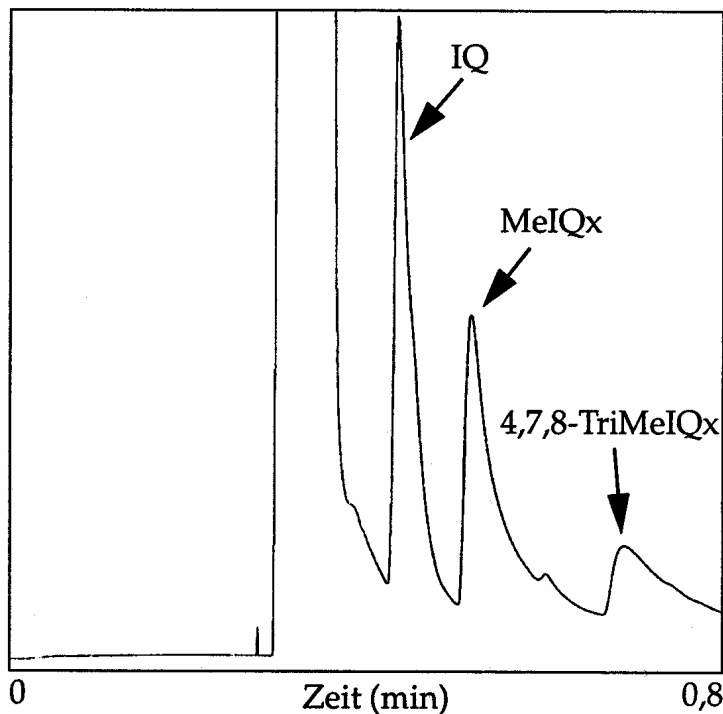
Für die CI muss das Massenspektrometer durch Austausch der Ionenquelle umgerüstet werden. Die CI-Ionenquelle ist im Vergleich zur EI-Ionenquelle so modifiziert, dass eine möglichst geschlossene Reaktionskammer vorliegt. Die in die Kammer von einem außenliegenden Filament emittierenden Elektronen werden mit 100 eV – 200 eV beschleunigt, um eine optimale Durchdringung im Reaktantgas zu bewirken. Die Elektroneneintrittsöffnung ist minimiert. Durch eine spezielle Flussführung des Reaktantgases wird dieses direkt in die Quelle geleitet. Um eine möglichst effiziente Reaktion zu gewährleisten, ist ein Verhältnis von Reaktantgas zu Probegas von 1000 zu 1 einzustellen, welches über ein entsprechendes Steuermodul geregelt werden kann. Der Partialdruck in der Ionenquelle beträgt etwa  $10^{-4}$  bar bis  $10^{-3}$  bar. Der Aufbau der Quelle ist so gestaltet, dass außerhalb der Reaktionskammer ein Partialdruck von  $10^{-5}$  bar erreicht wird, um die kollisionsfreie Ionenflugbahn zum Quadrupol-Analysator zu gewährleisten.

#### **2.3.6.4 Versuch der Trennung von underivatisierten HAAs – Notwendigkeit der Derivatisierung**

Schon in den Achtzigerjahren wurden erste Versuche beschrieben, HAAs direkt gaschromatographisch nachzuweisen und zu bestimmen (vgl. Takahashi et al. [Lit. 281] und Hatch et al. [Lit. 81]). Die HAAs weisen jedoch aufgrund ihrer hohen Polarität eine starke Neigung zur Adsorption an der Trennsäule auf, was zu einer geringen Nachweisempfindlichkeit führt. Skog et al. [Lit. 265] erfassten die Carboline Trp-P-1, Trp-P-2, A $\alpha$ C, MeA $\alpha$ C, Harman und Norharman ohne vorherige Derivatisierung mittels GC-MS im SIM-Modus. Eine weitere, über diese Publikation hinausgehende Anwendung dieser Methode, sowie die Anwendung auf die in Lebensmitteln auch vorkommenden HAAs aus der Gruppe der Chinoline und Chinoxaline sowie PhIP erfolgte nicht. Vollenbröker [Lit. 307] führte eine High-Speed-Trennung von nicht derivatisiertem IQ, MeIQx und 4,7,8-TriMeIQx an einer 15 m langen belegten Edelstahlkapillarsäule (MTX-1) durch. Bei der High-Speed-GC wird an speziell ausgerüsteten Gaschromatographen entweder der Trägergasvordruck der Säule auf 10 bar erhöht, oder es werden extrem hohe Aufheizraten des Säulenofens (bis 150 °C/min) gefahren. Aufgrund dieser extremen Trennparameter kann die GC-Trennung von HAAs nur an Edelstahlkapillarsäulen durchgeführt werden. Die Verweilzeit von Verbindungen, die zur Adsorption an der Säule neigen, wird auf wenige Minuten reduziert, sodass es zu einem geringen Tailing kommt. Abbildung 2.21 zeigt die von Vollenbröker durchgeführte High-Speed-GC-Trennung mit anschließender FID-Detektion. Die Peaks sind zwar, relativ zur kurzen Trennzeit von 1 min ge-

sehen, recht schlank, jedoch zeigt sich eindeutig der Verlust an Trennleistung. Der Verlust an Trennleistung kann nicht durch eine GC-MS-Kopplung mit massenselektiver Detektion der HAAs kompensiert werden, da während der Trennung Verunreinigungen nicht abgetrennt werden, die bei einem Standard GC-MS-Lauf mit dem so genannten „solvent delay“ ausgeblendet werden. Schon nach wenigen Läufen im SCAN-Modus wäre der SEV, die Detektoreinheit des massenselektiven Detektors, irreversibel geschädigt. Die High-Speed-GC eignet sich daher nicht zur Bestimmung der HAAs.

Um HAAs selektiv und empfindlich nachweisen und bestimmen zu können, wurden in den eigenen Arbeiten verschiedene Derivatisierungstechniken auf Anwendbarkeit und Praktikabilität hinsichtlich einer HAA-Routineanalytik getestet.



**Abbildung 2.21**

Highspeed-GC-Trennung von IQ, MeIQx und 4,7,8-TriMeIQx mit einem speziell umgerüsteten HP-6890-GC an einer belegten Edelstahlkapillare (MTX-1; 15 m, 0,28 mm ID, 0,1  $\mu$ m Film) Fluß 2,8 ml H<sub>2</sub>/min, Temperaturprogramm: 140 °C (0 min), mit 150 °C/min auf 290 °C

### 2.3.6.5 Derivatisierungstechniken

Zur Verbesserung der gaschromatographischen Trenneigenschaften der HAAs kommen Derivatisierungsreagenzien in Betracht, die eine Reaktion mit einem oder beiden aciden H-Atomen der aromatischen Amino-Gruppe eingehen. In den eigenen Arbeiten wurden in Anlehnung an Vorschriften für die Derivatisierung der Aminofunktion, speziell bei Aminosäuren und weiteren primären Aminen, verschiedene Derivatisierungstechniken hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf die Derivatisierung von HAAs getestet [Lit. 27, 135]. Ziel ist es, die

Polarität der Verbindungen herabzusetzen und die Flüchtigkeit des jeweiligen Analyten zu erhöhen.

## I. Acylierung

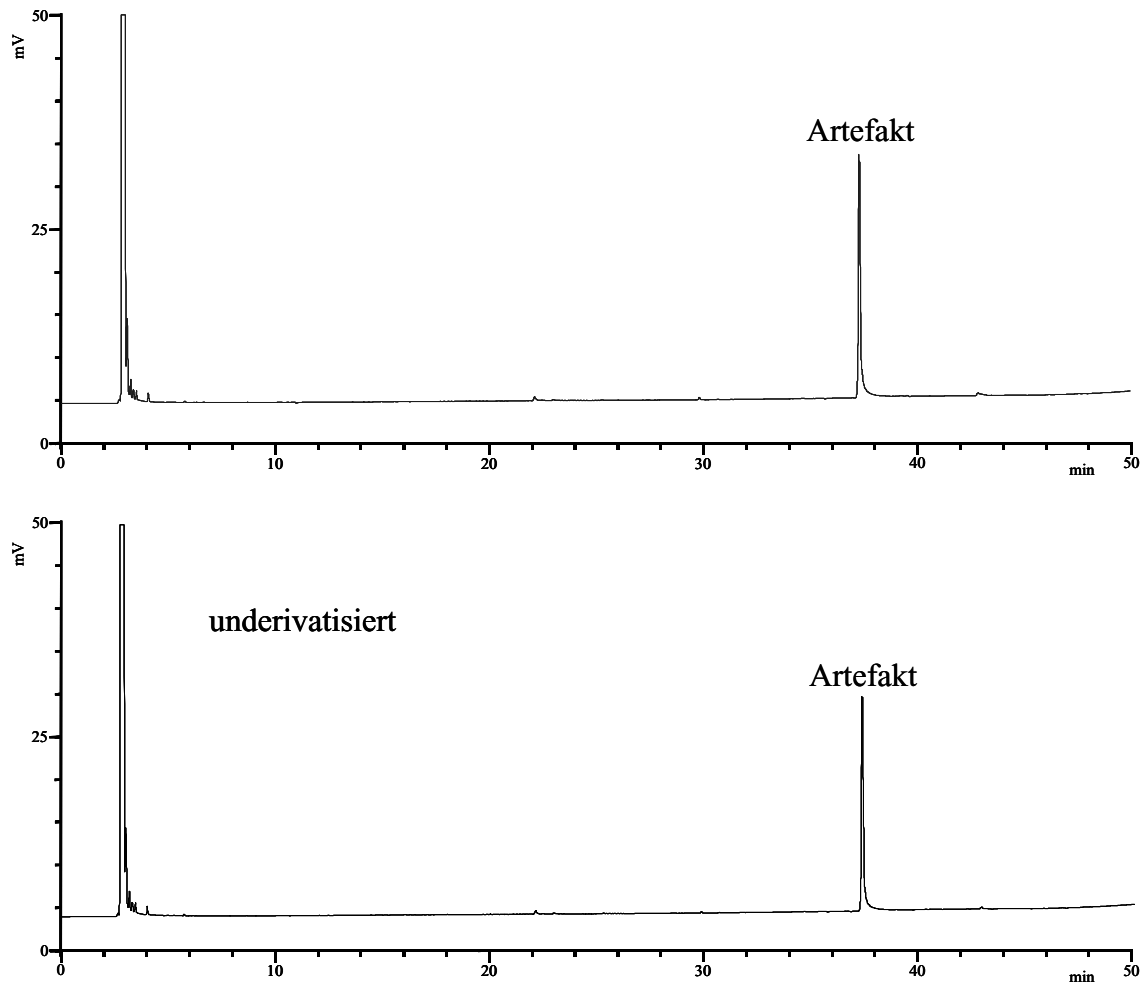
Bei der Acylierung von Aminen kommen in erster Linie Carbonsäureanhydride aufgrund ihrer großen Reaktivität infrage. Dabei entstehen stabile Carbonsäureamide [Lit. 135]. Diese zeigen eine gute Flüchtigkeit und können bei Verwendung von fluorierten Anhydriden auch zur Messung am ECD eingesetzt werden. Zudem verläuft die Derivatisierung recht zügig, und die Abtrennung der freien Säuren vom Reaktionsgemisch stellt kein großes Problem dar.

### a) Acylierung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA)

Die Umsetzung von Pentafluorpropionsäureanhydrid mit Aminen führt ebenfalls zur Bildung von Amid. Pentafluorpropionsäureamide sind sehr stabile Derivate mit guten chromatographischen Eigenschaften und einem guten Response am ECD.

Werden jeweils 10 µg MeIQx und 4,7,8-Tri-MeIQx – Mengen die bei vollständiger Umsetzung sicher mit dem ECD detektiert werden können – mit PFPA umgesetzt und gaschromatographisch analysiert, so lassen sich keine Unterschiede der mit dem Derivatisierungsreagenz umgesetzten Probe zu einer parallel aufgearbeiteten unterderivatisierten Probe erkennen. (vgl. entsprechende Chromatogramme in Abb. 2.22). Es ist anzunehmen, dass unter den gewählten Bedingungen keine Derivatisierung stattgefunden hat. Möglicherweise zersetzt sich das Pentafluorpropionsäureanhydrid schon aufgrund der gewählten Derivatisierungsbedingungen zu Pentafluorpropionsäure.

Vainiotalo et al. [Lit. 303] nutzten in ihren Arbeiten zur HAA-Analytik Heptafluorbuttersäureanhydrid, dessen Eignung als Derivatisierungsreagenz für die gaschromatographische Bestimmung von HAAs zuvor schon von Loprieno et al. [Lit. 162] beschrieben wurde. Sie konnten zwar Derivate mit GC-ECD nachweisen, die Derivatisierung wurde jedoch als nicht reproduzierbar und zu ausbeuteschwach bewertet. Reistad et al. [Lit. 230] konnten jedoch durch nachträgliche Methylierung am Azomethin-Stickstoff der bei der Derivatisierung entstehenden Heptafluorbuttersäureamide mit Diazomethan MeIQx, 4,8-DiMeIQx und PhIP in menschlichem Urin von Probanden, die scharf angebratenes Fleisch verzehrt hatten, sicher nachweisen und bestimmen. In den eigenen Untersuchungen brachte die Kombination von Acylierung mit PFPA und Methylierung mit Diazomethan keine weiteren Erkenntnisse.

**Abbildung 2.22**

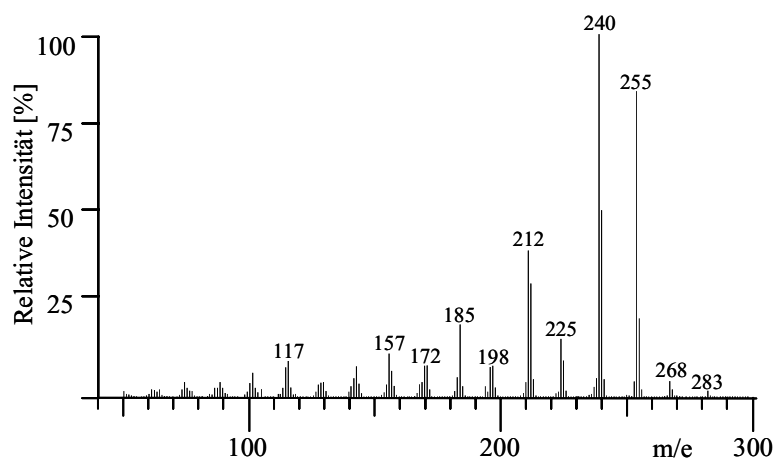
GC-ECD-Chromatogramm einer MeIQx-Standardlösung (10  $\mu\text{g}$  absolut) nach Umsetzung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (vgl. Kapitel 6.9.2, oben) und Blindlösung, underivatisiert (unten); Injektion 1  $\mu\text{l}$  (Split 1/20); Trennung: 60 m Quarzkapillare RTX-5.625, 0,25 mm i.  $\text{\O}$ , 0,25 mm Filmdicke; Temperaturprogramm: 100  $^{\circ}\text{C}$ , mit 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  auf 300  $^{\circ}\text{C}$ , von 300  $^{\circ}\text{C}$  auf 340  $^{\circ}\text{C}$  mit 10  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; Trägergas Wasserstoff 1,5 ml/min, Detektor: ECD vgl. Kapitel 6.8.3.1

## b) Acylierung mit Essigsäureanhydrid

Um HAAs quantitativ bestimmen zu können führte Schuirmann [Lit. 246] eine Acetylierung mit Acetanhydrid in Gegenwart von Pyridin durch. Er erhitze den Derivatisierungsansatz 30 min bei 100  $^{\circ}\text{C}$ . Die gaschromatographische Trennung erfolgte mit einem GC-ITD an einer DB-5.625-Kapillarsäule (Länge: 30 m, i. D.: 0,32 mm, Filmdicke: 0,25  $\mu\text{m}$ ) der Firma J&W. Dieser Säulentyp zeichnet sich durch eine besondere Desaktivierung aus (cross-linked), die ein Tailing basischer Verbindungen durch Adsorption verringert. So konnte er MeIQx und weitere HAAs in Fleischextrakt und in Kreatinin, Fructose und Glycin enthaltenden Modellsystemen sicher anhand ihres charakteristischen Fragmentierungsverhaltens nachweisen.

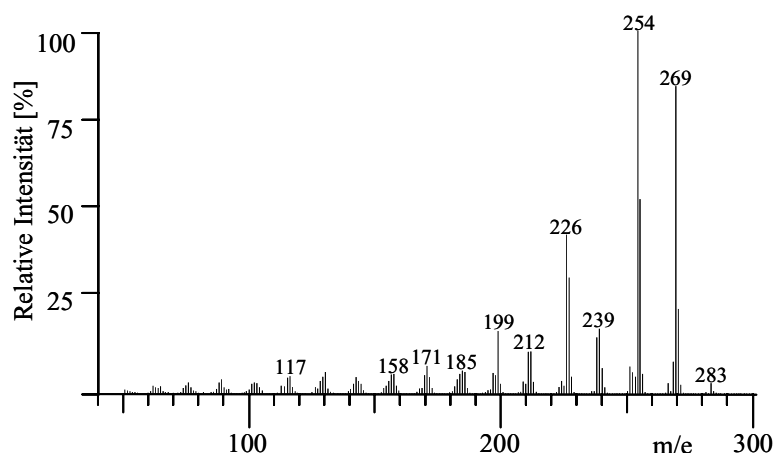
Schuirmann weist in seinen Arbeiten ausdrücklich darauf hin, dass die Adsorptionsneigung der HAAs die Effizienz der Trennung an der Kapillarsäule erheblich verschlechtert.

In den eigenen Arbeiten wurde daher zur Analytik von acetylierten HAAs eine neue, ausreichend konditionierte DB-5.625-Säule mit gleichen Abmessungen eingesetzt. Nach der Derivatisierung (vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.9.1) wurden die acetylierten HAAs mittels GC-Quadrupol-MS untersucht. Anhand von derivatisierten HAA-Standardlösungen konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise ein Nachweis der einzelnen HAAs anhand ihrer Fragmentierungsmuster nach Elektronenstoßionisation (EI) möglich ist. Charakteristische Fragmentierungsmuster von MeIQx und 4,8-DiMeIQx sind in Abbildung 2.23 bzw. in Abbildung 2.24 zu sehen.



**Abbildung 2.23**

Massenspektrum von acetyliertem MeIQx (vgl. 6.9.1),  $[M]^+ = 255$ ; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.25



**Abbildung 2.24**

Massenspektrum von acetyliertem 7,8-TriMeIQx (vgl. 6.9.1),  $[M]^+ = 269$ ; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.25

Auffallend ist eine hohe Intensität der Fragmente des Molekülpeaks  $[M]^+$ , des Fragmentes nach Abspaltung der Methylgruppe der Acetylgruppe  $[M-15]$  sowie des aus der Abspaltung der gesamten Acetylgruppe  $[M-43]^+$  entstandenen Fragmentes. Mit dem von Schuirmann beschriebenen Trennprogramm, das weiter optimiert wurde, ist eine quantitative Bestimmung

aufgrund einer schlechten Peaktrennung- und Peaksymmetrie nur schwer möglich. In Tabelle 2.2 findet sich die entsprechende Intensitätsverteilung der Fragmente von mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliertem MeIQx.

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
283	1,7	
269	2,0	
268	4,2	
257	2,1	
256	21,8	[M] <sup>+</sup>
255	84,1	
254	4,2	
242	4,9	[M-15] <sup>+</sup>
241	54,4	
240	100,0	
239	5,3	
238	2,6	
226	9,7	
225	15,9	
214	4,6	[M-43] <sup>+</sup>
213	31,6	
212	41,7	
198	8,7	
197	8,5	
185	20,5	
172	9,0	
171	8,6	
157	12,0	
144	8,6	
117	9,7	

**Tabelle 2.2**

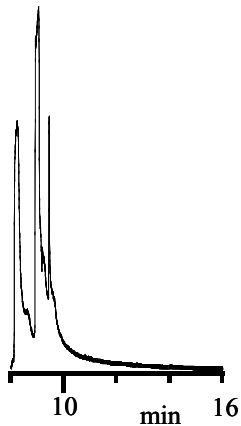
Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI von acetyliertem MeIQx (vgl. 6.9.1), GC-MS-Parameter siehe Abb. 2.25

In Abb. 2.25 ist die gaschromatographische Trennung einer acetylierten Standardlösung von 5 HAAs dargestellt (SCAN-Lauf). Eine klare Peakzuordnung ist hierbei nicht möglich. Im entsprechenden SIM-Lauf (vgl. Abb. 2.26) – es werden nur die jeweiligen [M-15]<sup>+</sup>-Fragmente der eingesetzten HAAs detektiert – ist zwar ein verbessertes Peakbild zu beobachten, jedoch fallen 7,8-DiMeIQx und PhIP im zweiten Peak zusammen.

Auch durch zahlreiche weitere Probeläufe ist es in den eigenen Arbeiten nicht gelungen, die Trennung dahingehend zu optimieren, dass sie zur standardmäßigen Bestimmung von HAAs geeignet ist.

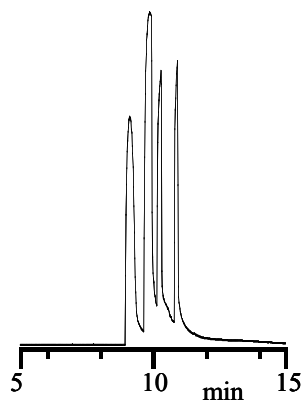
## II Alkylierung

Beim Alkylieren von Aminogruppen handelt es sich um den Austausch eines aktiven Wasserstoffes durch einen Alkylrest aus einem Halogenalkyl. Als Produkte entstehen N-Alkylamine. Die Reaktion stellt eine nucleophile Substitution dar.



**Abbildung 2.25**

GC-MS-EI-Trennung einer acetylierten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.1); Elutionsreihenfolge: MeIQx, 7,8-DiMeIQx und PhIP (fallen zusammen), 4,8-DiMeIQx und 4,7,8-TriMeIQx; Injektion 1 µl; Trennung: 30 m Quarzkapillare DB-5.625 (5 % Phenyl-, 95 % Methylsilikon, cross-linked), 0,32 mm i. Ø, 0,25 Filmdicke; Temperaturprogramm: 80 °C isotherm 1 min, von 80 °C bis 230 °C mit 30 °C/min, von 230 °C bis 290 °C mit 10 °C/min, 10 min isotherm, 290 °C bis 330 °C mit 25 °C/min, 5 min isotherm; Trägergas Helium, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150°C, SEV 1576 V, Scan-Modus 50 u bis 300 u



**Abbildung 2.26**

GC-MS-EI-Trennung einer acetylierten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.1); Elutionsreihenfolge: MeIQx, 7,8-DiMeIQx und PhIP (fallen zusammen), 4,8-DiMeIQx und 4,7,8-TriMeIQx; Injektion 1 µl; Trennung: vgl. Abb. 2.25, SIM-Modus: MeIQx (240, 255), 4,8- und 7,8-DiMeIQx (254, 269), 4,7,8-TriMeIQx (268, 283), PhIP (266)

a) Alkylierung mit 3,5-Bis(trifluormethyl)benzylbromid (TFBB)

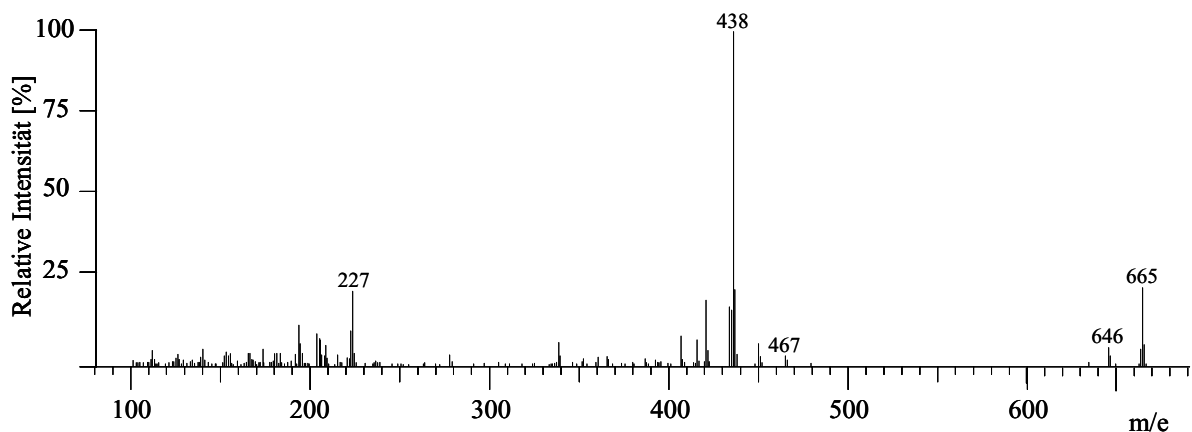
In der Rechtsmedizin wird häufig die Alkylierung mit TFBB eingesetzt. Man nutzt die gute Bestimmbarkeit von Analyten als Bisfluoromethylarylderivaten für ein standardisiertes Screening auf verschiedene Drogen [Lit. 198]. Eine auf Murray et al. [Lit. 199] zurückgehende Analytik von MeIQx und 4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx mittels GC-MS nach Umsetzung mit TFBB und negativer chemischer Ionisierung ist in vielen weiteren Arbeiten zitiert und weiterentwickelt worden. Murray selbst modifizierte diese Methode zur Bestimmung von PhIP [Lit. 200]. Tikannen et al. [Lit. 291] beschrieben die Bestimmung von MeIQx, 4,8-DiMeIQx und PhIP in einer finnischen Fischmahlzeit und im Weiteren den Einfluss einer Marinierung



auf den HAA-Gehalt in Hähnchenfleisch. Die Bestimmung weiterer HAAs misslang Tikannen trotz intensiver Bemühungen.

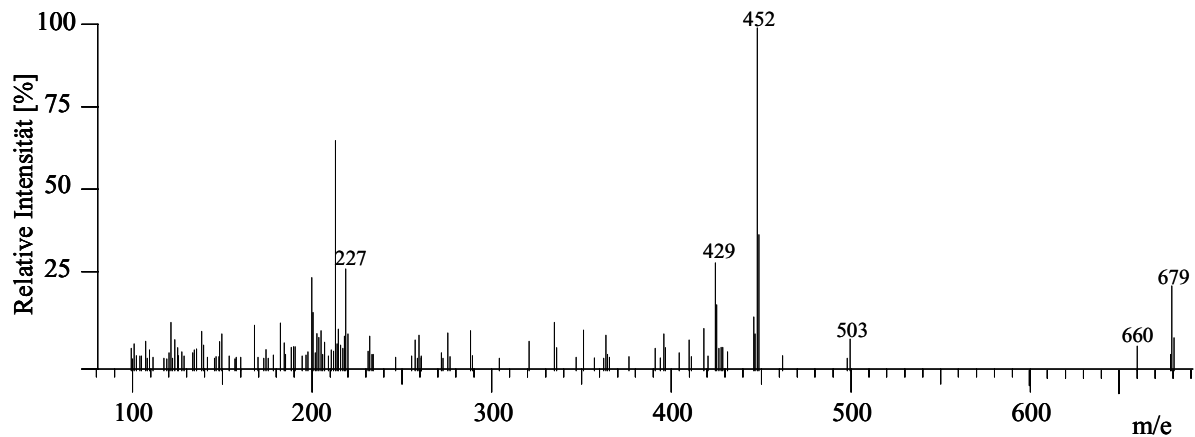
Vainiotalo et al. [Lit. 303] nutzten die von Murray entwickelte Derivatisierungstechnik in Verbindung mit der Elektronenstoßionisation zum Nachweis und zur Bestimmung von MeIQx und 4,8-DiMeIQx in Bratendämpfen. In ihren Arbeiten betrug die Nachweisgrenze 1 pg HAA pro aufgearbeiteter Probe sowohl für die Bestimmung mittels GC-MS-EI als auch mittels GC-MS-NCI. Bei der Verwendung eines GC-ECD beschrieben sie eine Nachweisgrenze von 10 pg HAA pro Probe. Richling entwickelte in ihren Arbeiten [Lit. 234, 235] die Methode von Murray zu einer – ihrer Meinung nach – routinetauglichen Bestimmung weiter. Entgegen den von Tikannen publizierten Erkenntnissen beschreibt Richling eine problemlose Derivatisierung von IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, Glu-P-1 und Glu-P-2. Darüber hinaus beschreibt sie sowohl mono- als auch disubstituierte Derivate. Aus den aufgereinigten Proben nicht abtrennbare Matrixbestandteile können aufgrund der hohen Reaktivität des Derivatisierungsreagenzes mitderivatisiert werden und so die Bestimmung mittels GC stören. Um derartige unerwünschte Derivate von den derivatisierten HAAs abzutrennen, wählte Richling eine der Derivatisierung (48 h, RT) nachgeschaltete Aufreinigung durch Flüssig-Flüssig-Verteilschritte mit Variation des pH-Wertes und Wechsel des Lösungsmittels.

In den eigenen Arbeiten konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. So konnten sowohl in derivatisierten Standardlösungen als auch in dotierten Realproben nach Aufreinigung der Derivate (vgl. Kapitel 6.9.3) lediglich die disubstituierten Derivate von MeIQx, 4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx und 4,7,8-TriMeIQx sicher nachgewiesen werden. Diese Derivate zeigen ein sehr charakteristisches Fragmentierungsmuster, wie in Abbildung 2.27 und Abbildung 2.28 dargestellt ist.



**Abbildung 2.27**

Massenspektrum des Di-3,5-bis-TFBB-Derivates von MeIQx (vgl. 6.9.3),  $[M]^+ = 665$ ; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.29

**Abbildung 2.28**

Massenspektrum des Di-3,5-bis-TFBB-Derivates von 4,8-DiMeIQx (vgl. 6.9.3),  $[M]^+ = 679$ ; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.29

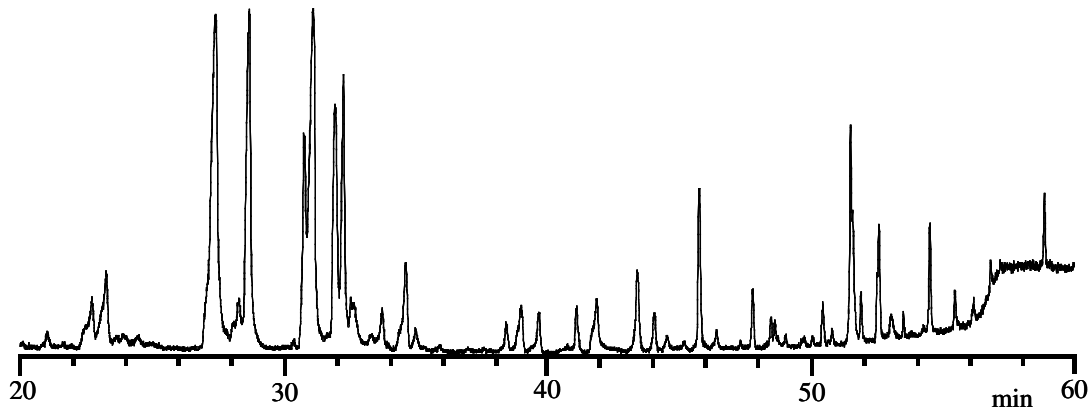
Die jeweiligen MS-Spektren zeigen die Di-3,5-bis-TFBB-Derivate von MeIQx und 4,8-DiMeIQx mit  $m/z = 665$  und  $m/z = 679$  und die Fragmentionen  $m/z = 438$  und  $m/z = 452$ , welche durch den Verlust der 3,5-Bis-trifluormethylbenzyl-Einheit ( $m/z = 227$ ) entstehen. Die Intensitätsverteilungen der einzelnen Fragmente (vgl. Tabelle 2.3) bleiben sowohl bei Standardproben als auch bei aufgearbeiteten und derivatisierten Matrixproben für diese Analyten konstant.

detektiertes $m/z =$	Intensität	Charakteristisches Fragment
666	8,9	$[M]^+$
665	22,1	
664	3,7	
647	2,9	$[M-19]^+$ / Abspaltung von Fluor
646	5,4	
439	23,8	$[M-227]^+$
438	100,0	
437	5,0	
436	8,1	
423	21,8	verschiedene Abspaltungen an den fluorierten Methylgruppen
418	6,0	
409	5,0	
341	3,7	
228	3,4	3,5-Bis-trifluormethylrest
227	19,9	
226	10,8	
199	3,2	$[M-2 \cdot 227]^+$
198	5,5	
197	11,3	
195	3,0	

**Tabelle 2.3**

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI des Di-3,5-bis-TFBB-Derivates von MeIQx (vgl. 6.9.1), GC-MS-Parameter siehe Abb. 2.29

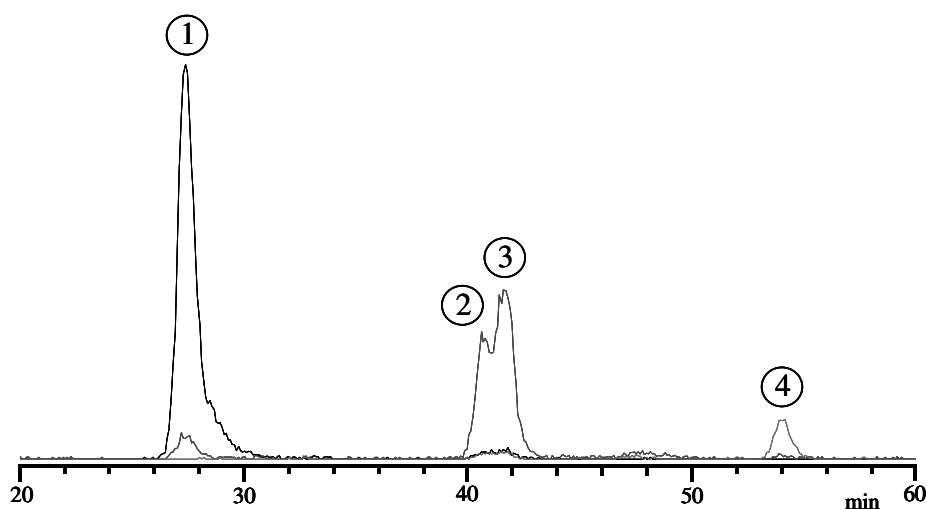
Abbildung 2.29 zeigt einen GC-MS-EI-Lauf im SCAN-Modus eines aufgearbeiteten und dotierten Hühnerfleischreaktionsaromas des Maillard-Typs. Darin lassen sich trotz der durchgeführten Aufreinigung der Derivate noch etliche Störpeaks erkennen.



**Abbildung 2.29**

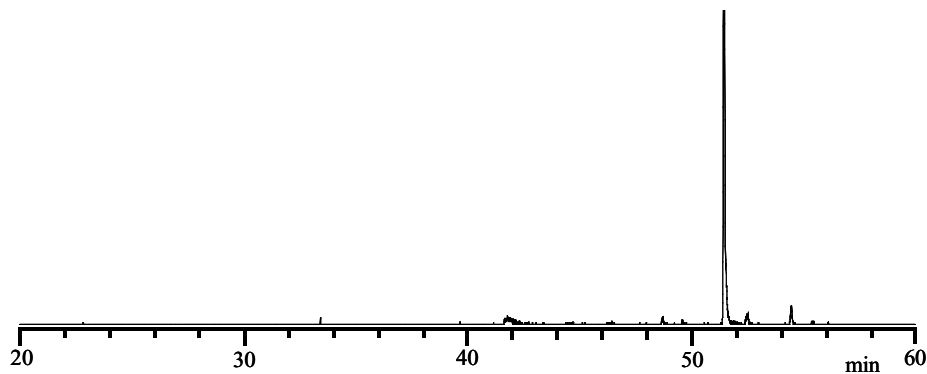
GC-MS-EI-Trennung eines mit 3,5-bis-TFBB umgesetzten (vgl. 6.9.3) dotierten Extraktes aus käuflichem Huhnfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5); Injektion 1  $\mu$ l; Trennung: 30 m Quarzkapillare DB-5.625 (5 % Phenyl-, 95 % Methylsilikon, cross-linked), 0,32 mm i.  $\varnothing$ , 0,25 mm Filmdicke; Temperaturprogramm: 80  $^{\circ}$ C, von 80  $^{\circ}$ C bis 150  $^{\circ}$ C mit 15  $^{\circ}$ C/min, 3 min isotherm, von 150  $^{\circ}$ C bis 220  $^{\circ}$ C mit 2  $^{\circ}$ C/min, von 220  $^{\circ}$ C bis 280  $^{\circ}$ C mit 5  $^{\circ}$ C/min, von 280  $^{\circ}$ C bis 300 mit 25  $^{\circ}$ C/min, 3 min isotherm, von 300  $^{\circ}$ C bis 325  $^{\circ}$ C mit 25  $^{\circ}$ C/min, Trägergas Helium, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionenenergie 70 eV, Ionenquelle 230  $^{\circ}$ C, Quadrupol 150  $^{\circ}$ C, SEV 1576 V, Scan-Modus 100 u bis 700 u

Durch rechnergestützte Analyse lassen sich aus den aufgezeichneten Rohdaten im SCAN-Modus die charakteristischen Massenspuren  $m/z = 438$  (MeIQx),  $m/z = 452$  (4,8- und 7,8-DiMeIQx), sowie  $m/z = 466$  (TriMeIQx) in einem Chromatogramm darstellen (vgl. Abb. 2.30). Die Peaks neigen zum Tailing. 4,8- und 7,8-DiMeIQx können nicht basisliniengetrennt werden. Obwohl gleiche Mengen an Analyten dem Hühnerfleischreaktionsaroma zudotiert wurden, zeigen sich stark unterschiedliche integrierte Peakflächen. Im SCAN-Modus können zwar Aussagen über die enthaltenen HAAs gemacht werden, jedoch ist lediglich eine qualitative Abschätzung der Gehalte an HAAs möglich. Ein GC-MS-Lauf im SIM-Modus ergab nur für das zudotierte 4,7,8-MeIQx ein auswertbares Peakbild (siehe Abb. 2.31).



**Abbildung 2.30**

Computergestützte Auswertung der GC-MS-EI-Trennung aus Abb. 2.29: Massenspuren 438, 452, 466; Zuordnungsable Peaks MeIQx (1), 4,8-DiMeIQx (2), 7,8-DiMeIQx (3), 4,7,8-TriMeIQx (4)

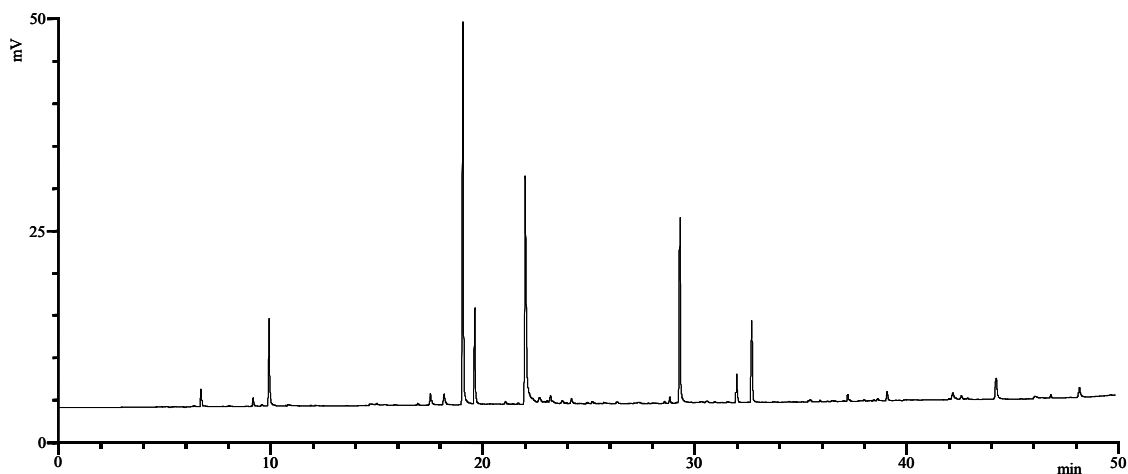


**Abbildung 2.31**

GC-MS-EI-Trennung eines mit 3,5-bis-TFBB umgesetzten (vgl. 6.9.3) dotierten Extraktes aus käuflichem Huhnfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5); Injektion 1 µl; Trennparameter vgl. Abb. 2.29, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, SIM-Modus: 4,7,8-TriMeIQx (466)

In den eigenen Arbeiten konnten die entsprechenden Di-bis-3,5-TFBB-Derivate der in den Derivatisierungsversuchen eingesetzten HAAs weder nach Negativer Chemischer Ionisation (NCI) mit Ammoniak noch nach NCI mit Methan mittels GC-MS detektiert werden.

Auch eine geringfügige Änderung der Derivatisierungsbedingungen durch Austausch der an der Alkylierung maßgeblich beteiligten Base N,N-Diisopropylethylamin durch die stärkere Base Triethylamin brachte keine weiteren Ergebnisse. Auch Isooctan statt Dodecan als Lösungsmittel der für die GC aufgereinigten Derivate führte zwar zu einer geringeren Anzahl an Störpeaks im Chromatogramm, aber zu keiner weiteren Verbesserung der Trenncharakteristik. Wie aus Abb. 2.32 hervorgeht, zeigte die Analyse der Probelösungen mit GC-ECD eine Vielzahl von Peaks, die aber nach Auswertung eines mit gleichem Temperaturprogramm gefahrenen GC-MS-Laufes keinen HAA-Derivaten oder sonstigen zur Derivatisierung eingesetzten Verbindungen zugeordnet werden konnten (vgl. Abb 2.32).



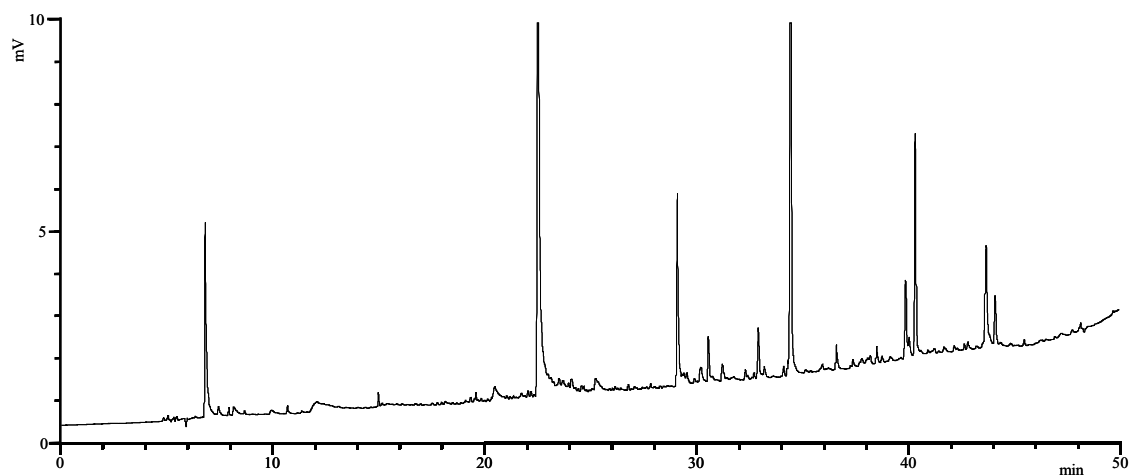
**Abbildung 2.32**

GC-ECD-Chromatogramm einer mit 3,5-bis-TFBB umgesetzten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.3); Injektion 1 µl (Split 1/20); Trennung: 60 m Quarzkapillare RTX-5.625, 0,25 mm i. Ø, 0,25 Filmdicke; Temperaturprogramm: 100 °C, mit 5 °C/min auf 300 °C, von 300 °C auf 340 °C mit 10 °C/min; Trägergas Wasserstoff 1,5 ml/min, Detektor: ECD vgl. 6.8.3.1, Zuordnung der Peaks zu den entsprechend derivatisierten HAAs nicht möglich.

b) Alkylierung mit  $\alpha$ -Bromopentafluorotoluol (2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid)

Bei mit  $\alpha$ -Bromopentafluorotoluol derivatisierten HAA-Standardlösungen (vgl. Arbeitsvorschrift 6.9.4) konnten mittels GC-ECD bzw. GC-MSD nur unzureichende Derivatisierungsergebnisse erzielt werden (siehe Abb. 2.33).

Bei der mittels GC/MS durchgeführten Analyse wurden nur Peaks gefunden, die andere als die erwarteten Massen zeigen und daher nicht zugeordnet werden konnten..



**Abbildung 2.33**

GC-ECD-Chromatogramm einer mit  $\alpha$ -Pentafluorotoluol umgesetzten HAA-Standardlösung (5  $\mu$ g HAA/ml, vgl. 6.9.4); Injektion 1  $\mu$ l (Split 1/20); Trennung: 60 m Quarzkapillare RTX-5.625, 0,25 mm i.  $\emptyset$ , 0,25 Filmdicke; Temperaturprogramm: 100  $^{\circ}$ C, mit 5  $^{\circ}$ C/min auf 300  $^{\circ}$ C, von 300  $^{\circ}$ C auf 340  $^{\circ}$ C mit 10  $^{\circ}$ C/min; Trägergas Wasserstoff 1,5 ml/min, Detektor: ECD vgl. 6.8.3.1; Zuordnung der Peaks zu den entsprechend derivatisierten HAAs nicht möglich.

Da sichergestellt werden sollte, dass die zu analysierenden Derivate nicht schon beim Injizieren zersetzt werden, wurde die Injektionstemperatur von 300  $^{\circ}$ C auf 250  $^{\circ}$ C gesenkt. Dies brachte aber keine weiteren Erkenntnisse. ESI-Massenspektren der derivatisierten Probenlösung wurden auf dem QUATTRO LCZ (Waters-Micromass, Manchester, UK) mit Nanosprayeinlaß erstellt. Es ließen sich sowohl im Full-Scan als auch im SIM-Modus keine Massen der erwarteten Pentafluorobenzyl-Derivate der HAAs nachweisen. Das Alkylierungsreagenz und seine typischen Fragmente konnten zwar wiedergefunden werden, jedoch war keiner der Standards zu finden. Auffällig bei diesen Analysen war das Vorhandensein einer markanten Fragmentierungsreihe mit dem Quasimolekülpeak ( $[M+H]^+$ )  $m/z = 431$ , der aber nicht zugeordnet werden konnte.

Auch Vainiotalo et al. [Lit. 303] konnten in ihren Arbeiten keine Pentafluorobenzyllderivate der HAAs nach Alkylierung nachweisen. Dagegen wurden von Friesen et al. [Lit. 61] der Nachweis von PhIP in biologischem Material wie Urin als Pentafluorobenzylderivat mittels

GC-MS-NCI beschrieben. Die quantitative Bestimmung erfolgte im SIM-Modus über das  $[M-C_6F_5CH_2]$ -Fragment mit PhIP- $d_6$  als innerem Standard.

### c) Methylierung

Die Herabsetzung der Polarität von Verbindungen, um ihre chromatographischen Eigenschaften zu verbessern, kann auch durch Methylierung erfolgen (vgl. standardisierte Analytik der Fettsäuremethylester [Lit. 5] und von methylierten Sterinen nach Schulte [Lit. 247]). Neben Natriummethylat, Trimethylsulfoniumhydroxid sowie Diazomethan findet das N,N-Dimethylformamid-dimethylacetal (DMF-DMA) Anwendung zur Methylierung von primären Aminen an der Amino-Funktion [Lit. 286]. Da DMF-DMA ein schlechtes Lösungsmittel ist, müssen protische Lösungsmittel wie Pyridin oder Aceton hinzugefügt werden. Es entstehen dann N-Dimethylaminomethylen-Derivate der entsprechenden Aminosäuren. Kataoka und Kijima [Lit. 123] beschreiben eine Trennung von Aminocarbolen und Amioimidazoazarenen mittels Gaschromatographie mit einem Stickstoff-Phosphor-selektiven Detektor (GC-NPD). In Testansätzen mit HAA-Standards konnten in eigenen Arbeiten mit DMF-DMA in Pyridin als Derivatisierungsreagenz mittels GC-MS keine derivatisierten HAAs nachgewiesen werden.

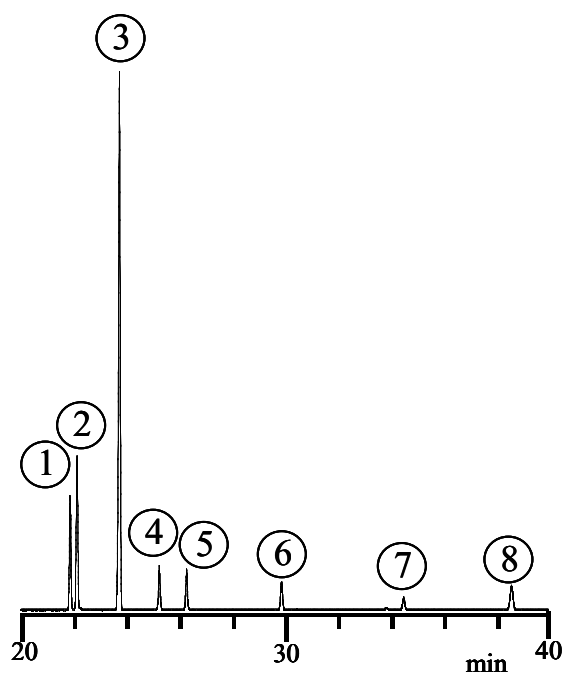
### III Silylierung

Die Silylierung bezeichnet den Ersatz von (aktiven) Wasserstoffatomen durch Trialkylsilylgruppen. Durch das Einführen dieser Gruppen verringert sich die Polarität. Zudem wird die Flüchtigkeit und die thermische Stabilität des Analyten wesentlich erhöht. Die bei den HAAs silylierbare funktionelle Gruppe ist die aromatische Aminogruppe. Die häufigste Art der Silylierung ist die Einführung einer Trimethylsilyl (TMS)-Gruppe in das Zielmolekül. Zusätzlich zum eigentlichen Derivatisierungsreagenz werden der entsprechenden Lösung geringe Mengen an Trimethylchlorsilan (TMCS) zugefügt, um die Silylierung zu befördern, damit diese bereits bei Temperaturen um 70 °C quantitativ verläuft. Da trimethyl-silylierte aromatische Amine sehr hydrolyseempfindlich sind, wurde bei den in den eigenen Arbeiten durchgeführten Derivatisierungsansätzen vornehmlich eine tert-Butyl(dimethyl)silyl-Gruppe in das Molekül eingeführt; diese wird in der Literatur als sehr hydrolysestabil beschrieben.

## a) Silylierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)

MSTFA ist das flüchtigste käufliche Trimethylsilylamid-Derivat. Außerdem ist MSTFA ein im Vergleich zu anderen gängigen Silylierungsmitteln wie N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) oder N,O-Bis-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (BSTFA) ein sehr starker TMS-Donor. So können Wasserstoffatome, die kaum aktiviert sind, mit MSTFA durch eine TMS-Gruppe ersetzt werden. Aufgrund seiner Flüchtigkeit – es entsteht N-Trimethyltrifluoracetamid – sind bei GC-FID-Messungen auch nach längeren Messreihen keine SiO<sub>2</sub>-Ablagerungen zu beobachten. Die meisten Verbindungen sind in MSTFA löslich; die Löslichkeit kann durch geringe Mengen an protischen Lösungsmitteln wie Pyridin weiter verbessert werden.

In den eigenen Arbeiten wurde eine Standardlösung, bestehend aus 9 HAAs, mit MSTFA silyliert (30 min für 70 °C, vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.9.5) und mit GC-MS näher untersucht. Wie aus Abbildung 2.34 ersichtlich, können alle HAAs gaschromatographisch voneinander getrennt werden.



**Abbildung 2.34**

GC-MS-EI-Trennung einer mit MSTFA derivatisierten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.5); Injektion 1 µl; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 Filmdicke; Temperaturprogramm: 180 °C, 3 min isotherm, von 180 °C bis 235 °C mit 5 °C/min, von 235 °C bis 270 °C mit 1 °C/min, von 270 °C bis 300 °C mit 10 °C/min, von 300 °C bis 320 °C mit 25 °C/min, 4 min isotherm, von 320 °C mit 340 °C mit 25 °C/min, Trägergas Helium, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus 200 u bis 400 u; Elutionsreihenfolge: Harman (1), Norharman (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), 4,8-DiMeIQx (5), 4,7,8-TriMeIQx (6), PhIP (7), MeAαC (8)

Die Peaks weisen eine für die GC optimale Peaksymmetrie auf. Bei Derivatisierungsansätzen, die, wie von Vollenbröcker [Lit. 307] vorgeschlagen, kurzzeitig auf 150 °C erhitzt werden, konnten in den eigenen Arbeiten keine höheren Ausbeuten an silylierten HAAs beobachtet

werden. Das deutet darauf hin, dass eine Reaktionstemperatur von 70 °C völlig ausreichend ist.

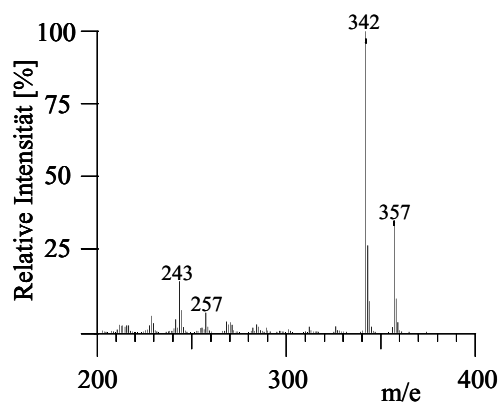
Die Fragmentierung nach EI der so silylierten-HAA Derivate ergibt eine charakteristische Intensitätsverteilung (vgl. Tabelle 2.4).

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
359	3,8	[M] <sup>+</sup>
358	11,4	
357	36,8	
344	10,6	[M-15] <sup>+</sup>
343	29,9	
342	100,0	
326	2,3	
285	3,2	[M-73] <sup>+</sup>
244	8,4	
243	17,1	
213	1,81	[M-2*73] <sup>+</sup>

**Tabelle 2.4**

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI von mit MSTFA derivatisiertem MeIQx (vgl. 6.9.5), GC-MS-Parameter siehe Abb. 2.34

Durch die Derivatisierung mit MSTFA werden die beiden Wasserstoffatome der Aminogruppe durch TMS-Gruppen ersetzt. So ergibt sich für das entsprechende di-TMS-Derivat von MeIQx (vgl. Fragmentierung in Abb. 2.35) eine Molekülmasse von 357. Im Spektrum zeigt sich neben dem starken Basepeak [M-15]<sup>+</sup> mit m/z = 342 ein relativ ausgeprägter Molekülpeak [M]<sup>+</sup> mit m/z = 357, was auf eine ausgeprägte Resonanzstabilisierung des bei der EI entstehenden Radikalkations schließen lässt. Versuche, aus derart silylierten HAAs durch positive chemische Ionisation mit Methan und Ammoniak Ionen zu erzeugen, misslingen. Da TMS-, besonders di-TMS-Derivate von primären Aminen recht hydrolyseempfindlich sind, müssen die frisch derivatisierten Lösungen direkt analysiert werden. Bei längerer Lagerung wird zunächst durch Hydrolyse wieder eine TMS-Gruppe abgespalten, was sich im GC-Chromatogramm durch Auftreten weiterer Peaks deutlich macht.



**Abbildung 2.35**

Massenspektrum des bis-TMS-Derivates von MeIQx (nach Silylierung mit MSTFA, vgl. 6.9.5), [M]<sup>+</sup>=357; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.34



Neben den di-TMS-Derivaten liegen einfach silylierte HAAs vor. Bei umfangreichen Messreihen wären in der Routineanalytik längere Standzeiten der silylierten Lösungen unvermeidbar, so dass die Proben dann teilweise hydrolysiert würden. Das gleichzeitige Auftreten von mono- und disubstituierten HAAs würde dann die quantitative Auswertung erheblich erschweren.

In den eigenen Arbeiten wurde die Silylierung mit MSTFA mit direkter Analyse am GC-MS für die Strukturabsicherung einzelner HAAs in komplexen Modellproben eingesetzt. Nachweisgrenzen von 25 ng HAA in 200 µl Derivatisierungslösung sind bei optimaler Einstellung der GC-MS möglich.

b) Silylierung mit (Pentafluorphenyl)dimethylchlorsilan (Flophemesyl)

Poole und Zlatkis [Lit. 226] konnten anhand von praktischen Derivatisierungsansätzen belegen, dass durch den Einbau höherer Alkyl- oder Arylgruppen die Stabilität der silylierten Derivate erhöht und dadurch die Hydrolyseempfindlichkeit erheblich gesenkt wird. Daher wurden zahlreiche Derivatisierungsreagenzien, die chemisch modifizierte TMS-Gruppen übertragen, auf den Markt gebracht. Ainseley et al. [Lit. 6] beschrieben in ihren Arbeiten bereits die Umsetzung von Alkoholen, Phenolen, Carbonsäuren und Aminen mit Flophemesyl zu Pentafluorphenyldimethylsilyl-Derivaten. Mit GC-ECD konnten sie eine Linearität der Bestimmung im Konzentrationsbereich von 5 ng bis 500 µg (jeweils bezogen auf 60 µl Derivatisierungslösung) feststellen. Der Versuch, Flophemesyl zur Derivatisierung von HAAs einzusetzen, scheiterte in den eigenen Arbeiten an der geringen Löslichkeit der HAAs in der Derivatisierungslösung.

c) Silylierung mit N-(tert.-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoracetamid (MTBSTFA) mit 1 % tert.-Butyldimethylchlorsilan (TBDMCS)

MTBSTFA eignet sich für die Derivatisierung von Hydroxyl-, Carboxyl- und Thiolgruppen sowie von primären und sekundären Aminen. Dabei wird in dem jeweiligen Molekül der aktive Wasserstoff gegen eine tert.-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Gruppe ausgetauscht. In einschlägigen Verkaufsprospekten wird eine um den Faktor  $10^4$  gesteigerte Stabilität von TBDMS-Ethern im Vergleich zu den entsprechenden TMS-Ethern propagiert. Erste Derivatisierungsversuche mit MTBSTFA publizierten Mahinney und Madson [Lit. 182] im Jahr 1982. Sie stellten MTBSTFA aus einer Mischung von N-Methyltrifluoracetamid und TBDMCS sowie andere N-tert.-Butyldimethylsilylamide präparativ als klare, farblose Flüssigkeiten her.

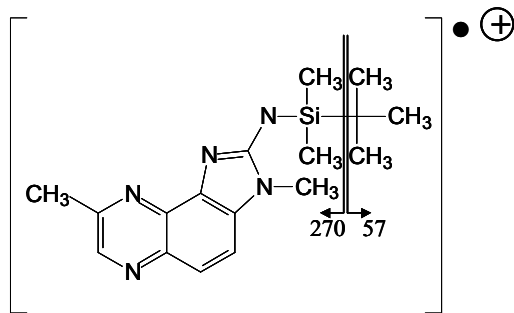
In Vergleichsuntersuchungen stellten sie heraus, dass MTBSTFA der stärkste TBDMS-Donor ist. Zu ihren umfassenden Erkenntnissen gehört auch, dass Derivatisierungen mit MTBSTFA sich durch kurze Reaktionszeiten (etwa 5 min bis 20 min) und hohe Ausbeuten um 95 % auszeichnen. Nicht verbrauchtes Silylierungsreagenz zerfällt im Injektorblock der GC in Trifluoracetamid und in den tert.-Butyldimethylsilyl (TBDMS)-Rest, der zu flüchtigen Si-Verbindungen dimerisiert.

Die Eigenschaft von MTBSTFA, dass funktionelle Gruppen reversibel in TBDMS-Ether überführt werden können, sorgte in der organischen Chemie vor allen Dingen dafür, dass die Schutzgruppenchemie mit MTBSTFA vorangetrieben wurde. Die TBDMS-Gruppe wird deshalb noch heute als Schutzgruppe für Ribonucleoside, Desoxyribonucleoside, komplexe Kohlenhydrate und Derivate von Leukotrienen, Steroiden und Vitamin D eingesetzt. Durch Anlösen der entsprechenden Derivate mit einer Lösung von Tetra-n-butylammoniumfluorid in THF bei 25 °C wird die TBDMS-Gruppe reversibel entfernt. Eine erste analytische Anwendung publizierten Donike und Zimmermann [Lit. 38] bei der Bestimmung von Oxo-Steroiden als O-Silyl-Testosteronolether mittels GC-FID und GC-MS. Sie stellten fest, dass sich das für TBDMS-Ether charakteristische Massenfragment  $[M-57]^+$  besonders für die quantitative Bestimmung der derivatisierten Verbindungen eignet.

Nahezu zeitgleich publizierten Biermann et al. [Lit. 24] und Mawhinney et al. [Lit. 183] eine Methode zur Bestimmung von Aminosäuren als TBDMS-Ether. Beide setzten eine Derivatisierungsmischung von 1% TBDMCS als Katalysator in MTBSTFA ein. Das zu analysierende Aminosäuregemisch wurde in 100  $\mu$ l Acetonitril gelöst, bevor es mit gleichen Teilen Derivatisierungsmischung versetzt und 1 h bei 95 °C (Biermann et al.) bzw. 25 min für 70 °C (Mawhinney et al.) inkubiert wurde. Die derivatisierten Amine wurde dann ohne weitere Aufreinigung direkt in die GC injiziert.

In den eigenen Arbeiten wurden diese Erkenntnisse zur Entwicklung einer geeigneten Derivatisierungsmethode für HAAs genutzt. Hierzu wurden die in Acetonitril gelösten Proben mit einer Mischung von N-Methyl-N-tert.-Butyldimethylsilyltrifluoracetamid und tert.-Butyldimethyl-chlorsilan (99+1, w/w) versetzt und bei 70 °C im Trockenschrank 30 min inkubiert.

Es lassen sich stabile Derivate der Aminoimidazochinoline bzw. -chinoxaline, der Pyridoimidazole MeA $\alpha$ C, Harman und Norharman sowie von PhIP mittels GC-MS nachweisen. Bevorzugt ist bei diesen die Abspaltung eines tert.-Butylrestes vom durch die Ionisation entstandenen Radikalkation, wie in Abbildung 2.36 für MeIQx schematisch dargestellt.

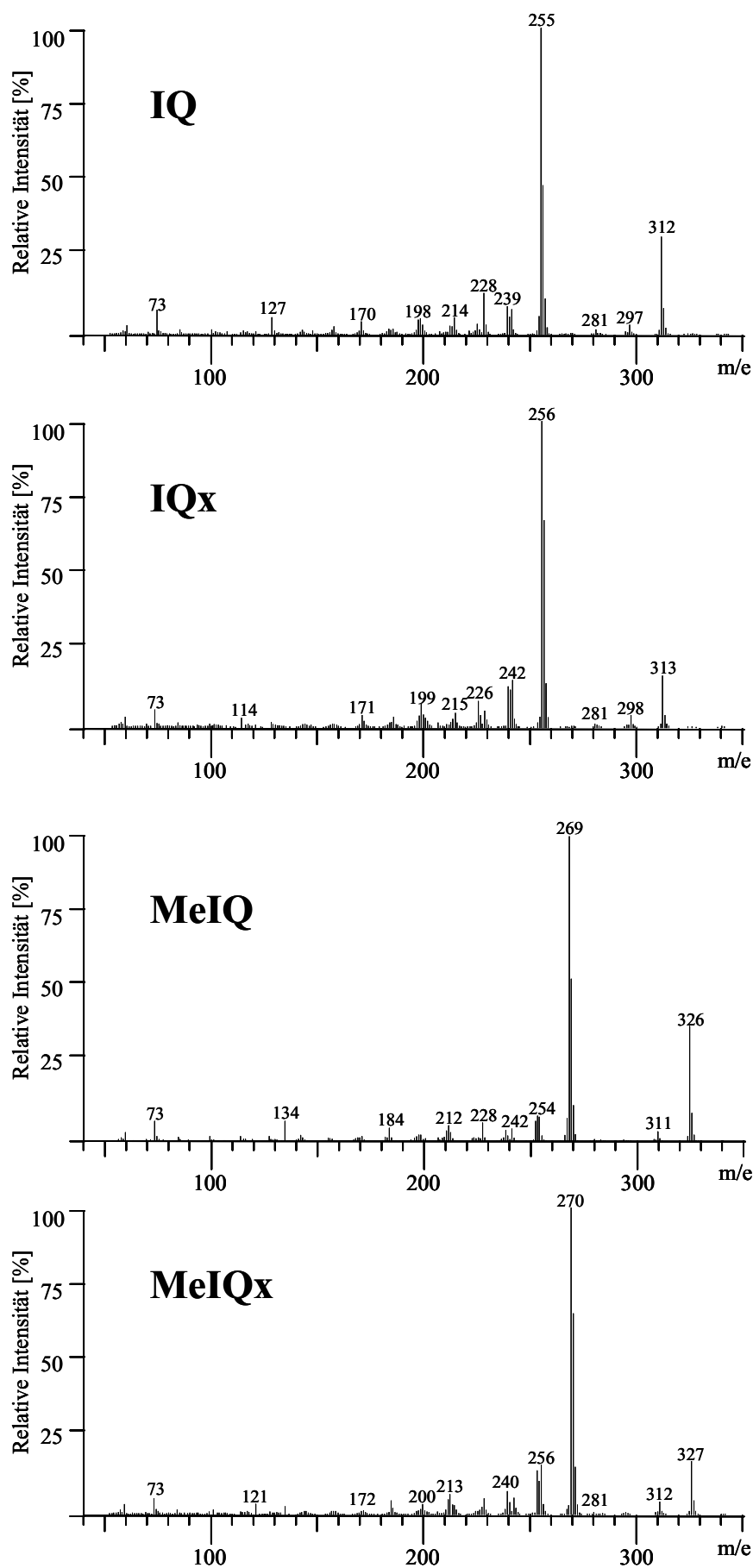
**Abbildung 2.36**

Schematische Darstellung der Hauptfragmentierung des TBDMS-Derivates von MeIQx (Elektronenstoßionisation)

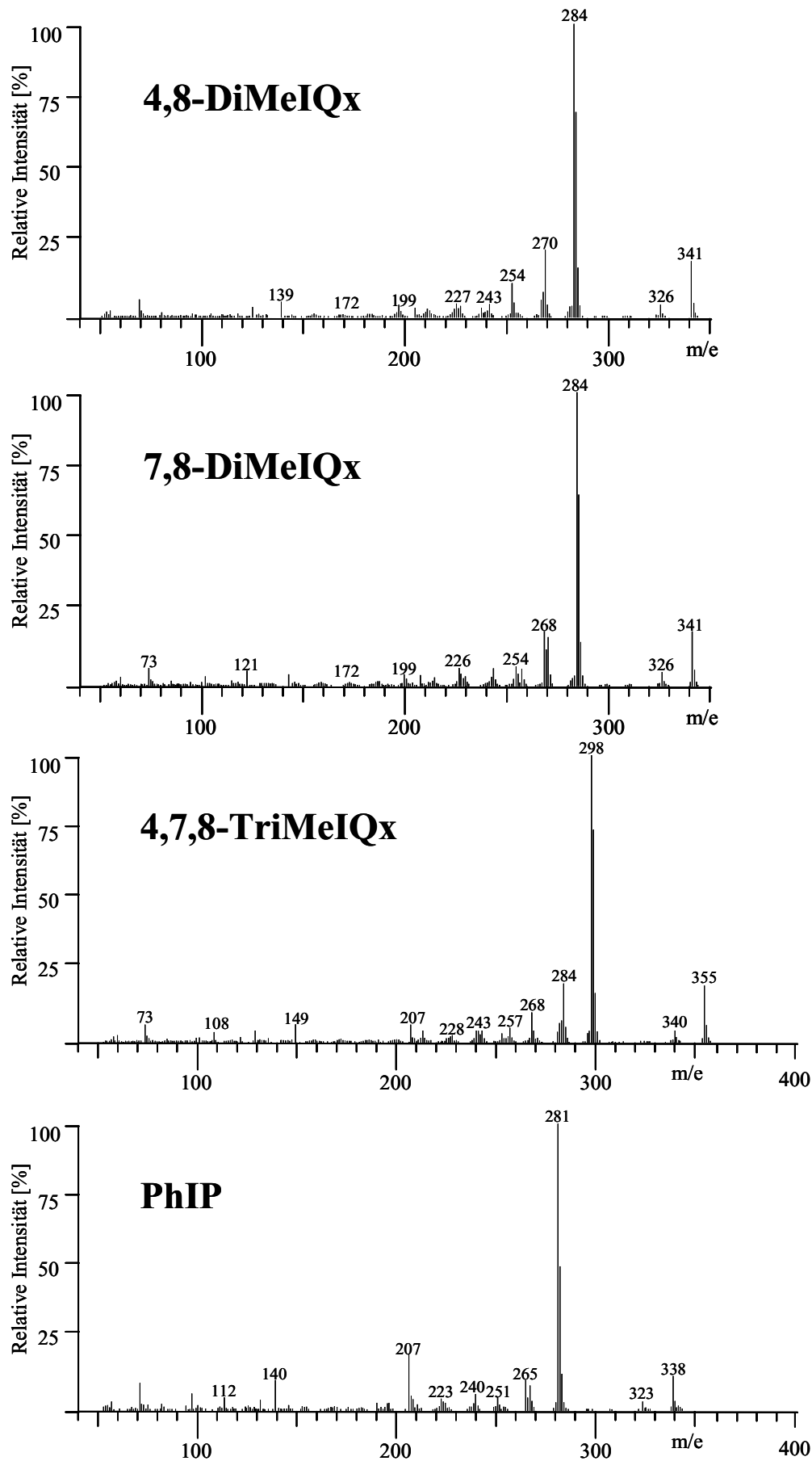
Jedes der untersuchten HAAs lässt sich anhand eines spezifischen Fragmentierungsmusters identifizieren. In Abbildung 2.37 sind beispielhaft die Fragmentierungsmuster für IQ, IQx, MeIQ, MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx und PhIP abgebildet.

Das durch Abspaltung des tert.-Butylrestes entstandene Hauptfragment  $[M-57]^+$  ist jeweils eindeutig als stärkstes Fragment zu erkennen. An der Intensitätsverteilung der wichtigsten Fragmente des TBDMS-Ethers von MeIQx nach EI (vgl. Tab. 2.5) wird deutlich, dass die Abspaltung einer Methylgruppe  $[M-15]^+$  oder die Abspaltung der tert.-Butyldimethylsilylgruppe  $[M-115]^+$  weniger bevorzugt ist.

Die TBDMS-Derivate der HAAs lassen sich sehr gut gaschromatographisch trennen. Auch die Bestimmung nach Positiver Chemischer Ionisation mit Methan oder Ammoniak als Reaktandgas ist möglich. Um die Bestimmung der HAAs über ihre TBDMS-Ether zu optimieren, wurden umfangreiche Messreihen neben dem GC-ITD besonders mit dem GC-Quadrupol-MS durchgeführt (siehe dazu Kapitel 2.3.6.6).

**Abbildung 2.37**

Massenspektren der TBDMS-Derivate von IQ, IQx, MeIQ, MeIQx (nach Silylierung mit MTBSTFA, vgl. 6.9.6),  $[M]^+$ =312, 313, 326 bzw. 327; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.44

**Abbildung 2.37 Fortsetzung**

Massenspektren der TBDMS-Derivate von 4,8- und 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx und PhIP (nach Silylierung mit MTBSTFA, vgl. 6.9.6),  $[M]^+ = 341, 355$  bzw.  $338$ ; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 2.44

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
329	1,0	[M] <sup>+</sup>
328	4,3	
327	17,3	
326	0,8	
313	1,1	[M-15] <sup>+</sup>
312	4,0	
311	0,7	
272	14,9	[M-57] <sup>+</sup>
271	67,3	
270	100,0	
269	2,7	
256	16,9	
255	10,9	
254	14,6	
240	7,8	
213	5,2	[M-114] <sup>+</sup>

**Tabelle 2.5**

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI von mit MTBSTFA derivatisiertem MeIQx (vgl. Kapitel 6.9.6), GC-MS-Parameter siehe Abb. 2.44

### 2.3.6.6 Quantitative Bestimmung der HAAs als tert.-Butyldimethylsilyl-derivate mit GC-MS

Bei der Auswahl einer praxistauglichen Bestimmungsmethode zur quantitativen Erfassung von HAAs mittels GC-MS nach Derivatisierung sollte darauf geachtet werden, dass diese mehrere Voraussetzungen erfüllt:

Die Umsetzung zu den entsprechenden Derivaten muss nahezu quantitativ erfolgen. Geringfügige Änderungen der Derivatisierungsbedingungen, die gelegentlich unvermeidbar sind, sollten die Qualität des Derivatisierungsschrittes nicht beeinflussen. Die eigentliche Derivatisierung sowie die ggf. notwendige Aufreinigung sollten sich auf maximal eine Stunde erstrecken, um einen möglichst hohen Probendurchsatz in der Routineanalytik zu ermöglichen. Je weniger Arbeitsschritte während der Derivatisierung durchgeführt werden müssen, umso eher eignet sich die Bestimmungsmethode für eine Automatisierung. Um die Ergebnisse weiter abzusichern, müssen die Derivate an verschiedenen polaren Säulen trennbar sein. Von Vorteil ist es, wenn die Derivate auch mittels GC-MS-PCI bestimmt werden können.

In den eigenen Arbeiten zeigte ein Vergleich der getesteten Derivatisierungstechniken für HAAs (vgl. Kapitel 2.3.7.5 I bis III), dass es am vorteilhaftesten ist, die HAAs in ihre tert.-Butyl-derivate zu überführen. Um die Bestimmung der HAAs als tert.-Butyldimethylsilyl-derivate auf ihre Routinetauglichkeit zu prüfen, wurden wesentliche Elemente einer Validierung wie Untersuchungen zur Präzision, Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit anhand von Standardreihen mit definiert zugesetzter Matrix durchgeführt. Als innerer Standard diente

2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo-[4,5-f]-chinoxalin (TriMeIQx). Die jeweiligen Responsefaktoren sind zwar konstant und matrixunabhängig, weichen aber zum Teil sehr vom Wert 1 ab, was jedoch durch den Einsatz deuterierter Standards korrigiert werden kann. Umfangreiche Analysen von dotierten Realproben (Lebensmittel und Reaktionsaromen) zeigen eine Linearität der Bestimmung im Konzentrationsbereich von 8 ng/g bis 8 µg/g Probe. Die quantitative Bestimmung erfolgte im SIM-Modus über stabile Fragmente der tert.-Butylsilylderivate (Elektronenstoßionisation:  $[M-57]^+$ ; Positive Chemische Ionisation (CI) mit Methan und Ammoniak als Reaktandgas:  $[M+H]^+$ ; Negative CI mit Ammoniak:  $[M-H]^+$ ). Im SCAN-Modus können ebenfalls silylierte Nebenprodukte mit erfasst werden. Die Robustheit dieser Methode zeigt sich u. a. in der Einsetzbarkeit verschiedener Säulentypen (DB-1, DB-5.625, RTX-5) sowie in der Haltbarkeit der Derivatisierungsansätze über mehrere Wochen. Eine Verkürzung der Aufarbeitung, die lediglich in einer salzsauren Extraktion mit anschließender Isolierung der HAAs durch eine alkalische Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan besteht, wurde an mehreren Modellmischungen getestet. Die beschriebene Bestimmungsmethode kommt zwar nicht an die Nachweisgrenze und Präzision der HPLC-ESI-MS/MS-Methoden heran, jedoch kann sie als Screening-Methode eingesetzt werden. Ferner ist mit dieser GC-Methode ein Einsatz von deuterierten Standards sowie die Auswertung von Labeling-Experimenten möglich.

#### I. Versuch der quantitativen Auswertung über GC-ITD

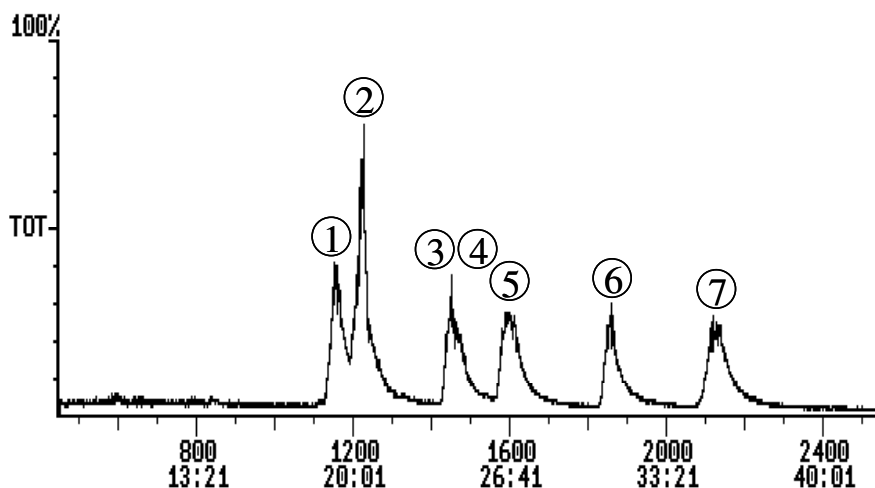
Aufgrund der Messanordnung ist prinzipiell ein Ionenfallenmassenspektrometer (ITD) einem Quadrupol-Massenspektrometer bei der quantitativen Bestimmung mittels GC-MS vorzuziehen. Das Prinzip des ITD beruht darauf, dass alle entstandenen Ionen „gespeichert“ werden und so selektiv nacheinander detektiert werden können. Demgegenüber wird bei einem Quadrupol-Massenspektrometer, welcher im Wesentlichen aus einem Massenfilter mit nachgeschaltetem SEV besteht, nur ein Teil der Ionen detektiert. Der Massenfilter bewirkt, dass bei der selektiven Detektion von Ionen einer bestimmten Masse die übrigen Ionen abgelenkt und somit nicht erfasst werden. In den Achtziger- und den frühen Neunzigerjahren wurde bei der Bestimmung verschiedenster Analyten mittels GC/MS der ITD präferiert, da mit diesem gegenüber dem Quadrupol-MS eine Empfindlichkeitssteigerung erreicht werden konnte. Da in den vergangenen Jahren ausschließlich die Quadrupolgeräte weiterentwickelt wurden, erreichen diese inzwischen die gleiche bzw. oft auch eine höhere Empfindlichkeit als ITD-Geräte.

Ein großer Vorteil des ITD liegt in der Möglichkeit, mit dem gleichen System durch ein einfaches Zuschalten der Reaktandgaszufuhr und Ändern einiger Parameter in der Ion-Trap-

Software, die EI durch eine CI zu ersetzen. So besteht die Möglichkeit, zeitnah von einzelnen Probenreihen jeweils EI- und CI-Läufe zu messen. Durch die Speicherung der geladenen Ionen in der Ionenfalle ist deren Ionisierung und Detektion zeitlich versetzt, sodass es durch geeignete Wahl der Messparameter möglich ist, Störungen aus der Matrix auszublenden und die Empfindlichkeit zu steigern. In neueren HPLC-MS/MS-Geräten wird deshalb oft eine Ionenfalle nachgeschaltet, um eine verbesserte quantitative Bestimmung verschiedenster Analyten zu erreichen.

In den eigenen Versuchen konnte das zur Verfügung stehende ITD-Massenspektrometer der Firma MAT/Finnigan nur bedingt genutzt werden, da keine geeignete Trennmethode entwickelt werden konnte, die die oben genannten Voraussetzungen für die Analytik von HAAs aus komplexen Matrices erfüllt.

Wie aus Abbildung 2.38 ersichtlich, können MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, PhIP und MeA $\alpha$ C im EI-Modus zwar getrennt werden; jedoch zeigen die Peaks ein starkes Tailing, welches die quantitative Auswertung erschwert. Dieses Tailing entsteht durch ein zum Teil auftretendes Kondensieren der Probenmoleküle an der nur bis 230 °C aufheizbaren Transferline des Gaschromatographen zum ITD.



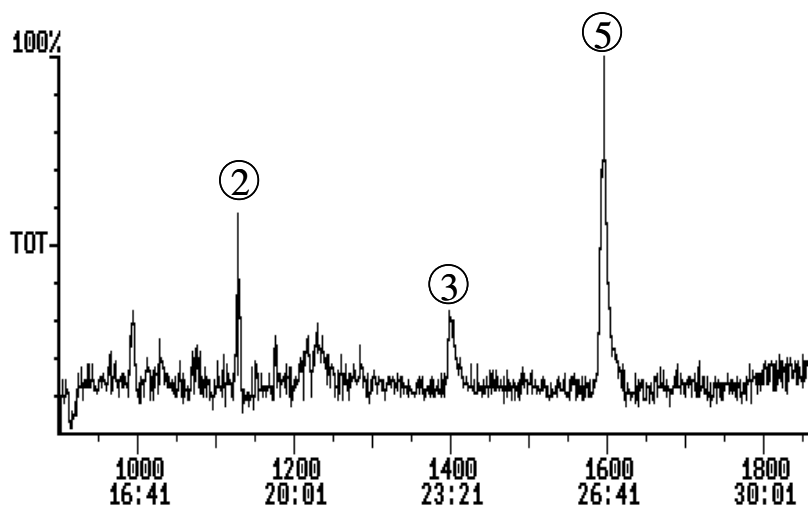
**Abbildung 2.38**

GC-MS-ITD-Trennung einer mit MTBSTFA silylierten HAA-Standardlösung (10  $\mu$ g HAA/ml, vgl. 6.9.6); Elutionsreihenfolge: IQx (1), MeIQx (2), 7,8-DiMeIQx (3), 4,8-DiMeIQx (4), 4,7,8-TriMeIQx (5), PhIP (6), MeA $\alpha$ C (7); Injektion 1  $\mu$ l; Trennung: 30 m Quarzkapillare DB-5.625 (5 % Phenyl-, 95 % Methylsilikon, cross-linked), 0,32 mm i.  $\varnothing$ , 0,25 mm Filmdicke; Temperaturprogramm: von 40 °C auf 180 °C mit 30 °C/min, von 180 °C auf 220 °C mit 8 °C/min, von 220 °C auf 230 °C mit 1 °C/min, von 230 °C auf 240 °C mit 1,5 °C/min, von 240 °C auf 320 °C mit 25 °C/min, 4 min isotherm; Trägergas Helium, weiter Geräte- und Messparameter vgl. 6.8.4.1



Dieser Effekt zeigt sich besonders bei 4,7,8-TriMeIQx, PhIP und MeA $\alpha$ C. Trotz Variation des Temperaturprogramms gelang es in den eigenen Arbeiten nicht, 4,8- und 7,8-DiMeIQx aufzutrennen.

Bei der Analyse von Realproben ist eine genaue Bestimmung der jeweiligen Analyten nur bedingt möglich, da durch die vorliegende Matrix ein hohes chemisches Rauschen bewirkt wird. Beispielhaft ist in Abbildung 2.39 eine Trennung von MeIQx, 7,8-DiMeIQx und 4,7,8-TriMeIQx aus einem zuvor mit 4,7,8-TriMeIQx als innerem Standard dotierten und zur Analytik der HAAs entsprechend aufgearbeiteten Rindfleischreaktionsaroma dargestellt.



**Abbildung 2.39**

GC-MS-ITD-Trennung eines Extraktes aus käuflichem Rindfleischreaktionsaroma (Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. 6.9.6), Zusatz von innerem Standard 4,7,8-TriMeIQx; Elutionsreihenfolge: MeIQx (2), 7,8-DiMeIQx (3), 4,7,8-TriMeIQx (5), Injektion 1  $\mu$ l; Trennung: 30 m Quarzkapillare DB-5.625 (5 % Phenyl-, 95 % Methylsilikon, cross-linked), 0,32 mm i.  $\varnothing$ , 0,25 mm Filmdicke; Temperaturprogramm: von 40 °C auf 180 °C mit 30 °C/min, von 180 °C auf 220 °C mit 8 °C/min, von 220 °C auf 230 °C mit 1 °C/min, von 230 °C auf 240 °C mit 1,5 °C/min, von 240 °C auf 320 °C mit 25 °C/min, 4 min isotherm; Trägergas Helium, weitere Geräte- und Messparameter vgl. Kapitel 6.8.4.1

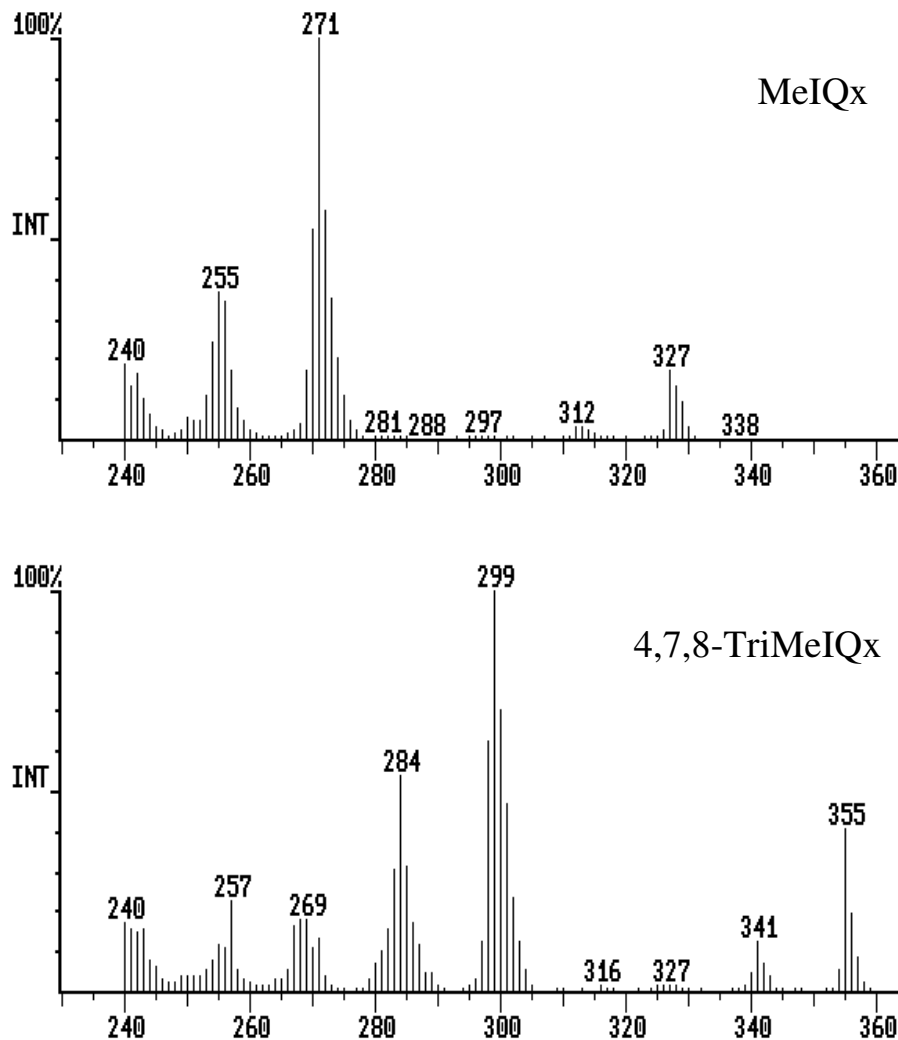
Im weiteren Verlauf der eigenen Arbeiten wurde keine weitere Methodenentwicklung mit dem ITD betrieben.

Die beschriebene GC-ITD-Methode kann generell zur qualitativen Absicherung eingesetzt werden, da man für die einzelnen aufgetrennten HAAs jeweils aussagekräftige Massenspektren, wie die für MeIQx und 4,7,8-TriMeIQx in Abbildung 2.40, im EI-Modus erhält. Weitere Spektren finden sich im Anhang unter Kapitel 8.1.

## II. Optimierung der gaschromatographischen Trennung, Ionisierungsbedingungen und Detektionsmodi

In den eigenen Arbeiten wurde bei der Bestimmung von HAAs als tert.-Butyldimethylsilylether (TBDMS-Ether) mittels GC-MS die chromatographische Trennung

optimiert, verschiedene Ionisationsarten und Ionisierungsbedingungen getestet sowie die geeignetsten Detektionsmodi ausgewählt.

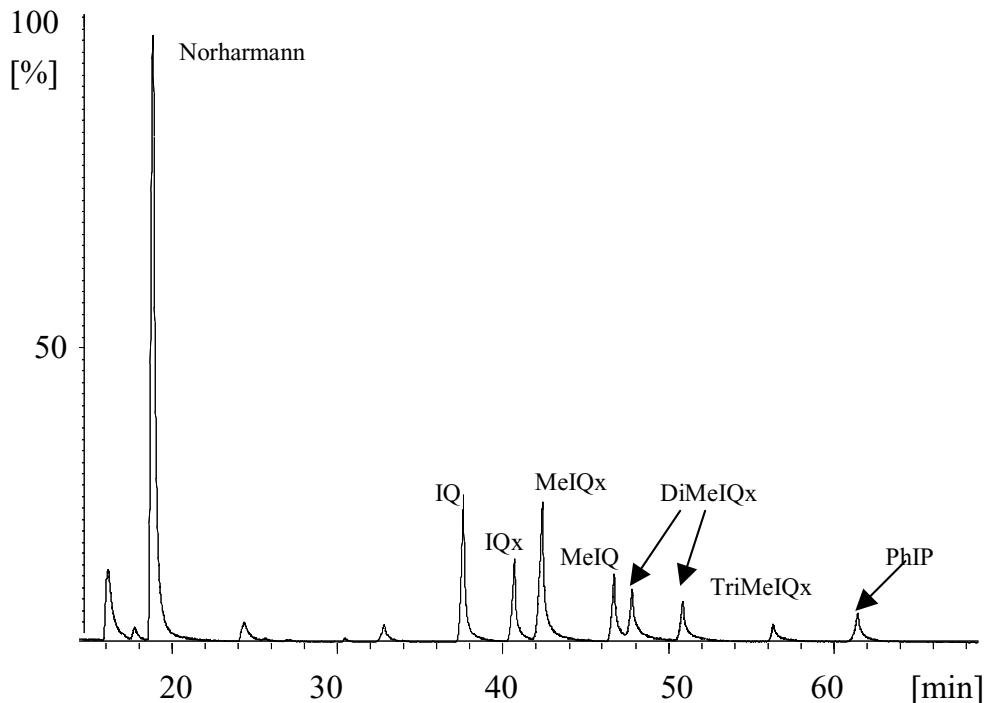


**Abbildung 2.40**

Massenspektrum von mit MTBSTFA silyliertem MeIQx (oben) und 4,7,8-TriMeIQx (unten) (vgl. 6.9.6),  $[M]^+ = 327$  bzw. 355; GC-Trennung: siehe Abb. 2.38, ITD-Detektion: Multiplier 2200; B-Sensitivity 5000, weitere Parameter siehe 6.8.4.1

Da es sich bei den Chinolinen und Chinoxalinen innerhalb der Gruppe der HAAs um strukturell ähnliche Verbindungen handelt, erwies sich die gaschromatographische Trennung zunächst problematisch. Mit üblichen Temperaturgradienten von 5 °C/min und „Split/Splitless“-Injektion (Splitventil für 1 min geschlossen; in der Spurenanalytik üblich, da so die komplette verdampfte Substanz auf die Säule gebracht wird) zeigt sich kein zufrieden stellendes Trennergebnis. Die Peaks haben zwar eine geringe Peakbreite, sie überlappen sich jedoch. Wird der Temperaturgradient weiter abgeflacht, z. B. auf 1 °C/min, so zeigen die Peaks ein Tailing, das auch durch einen erhöhten Trägergasfluss nicht vollständig verschwindet (vgl. Abb. 2.41).

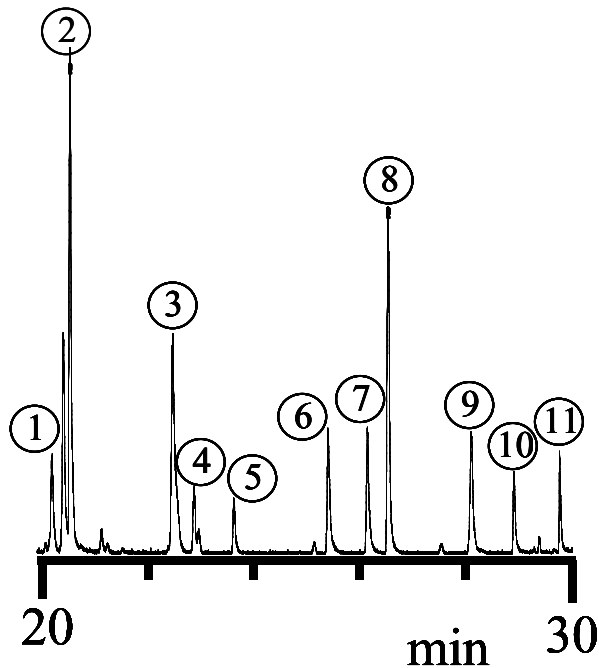
Das Tailing kann vermindert werden, wenn die „Split“-Injektion angewandt wird. Dabei gelangt aber weniger Analyt auf die Säule, wodurch die Empfindlichkeit der Methode dementsprechend sinkt.



**Abbildung 2.41**

GC-MS-EI-Trennung einer mit MTBSTFA silylierten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.6); Injektion 1 µl; Trennung: 60 m Quarzkapillare RTX-5 (95 % Phenyl-, 5 % Methylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm: von 180 °C bis 270 °C mit 1 °C/min, von 270 °C bis 300 °C mit 10 °C/min, von 300 °C bis 340 mit 25 °C/min, 2 min isotherm, Trägergas Helium 1,9 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus 200 u bis 400 u

Erst durch Nutzung der so genannten „Pulsed Split/Splitless“-Injektion konnte die chromatographische Trennung verbessert werden. Bei dieser Injektion wird zunächst der Säulenvordruck erhöht. Damit geht ein erhöhter Trägergasfluss einher, der bewirkt, dass die im Injektorblock verdampfte Probe innerhalb kürzester Zeit auf die Kapillarsäule gelangt. Nach etwa 12 sec kann das Splitventil wieder geöffnet werden. Eventuell vorhandene schwerer flüchtige Bestandteile der Probenlösung gelangen so nur bedingt auf die Trennsäule, sodass weniger aus der Probenlösung stammende gasförmige Matrix-Moleküle mit der Säulenbelegung wechselwirken. Ein geringeres Tailing ist die Folge. Der Säulenvordruck kann nach 1,5 min wieder auf ein normales Niveau gesenkt werden. Die Nutzung eines englumigen Glasliners unterstützt den schnellen Übergang der Probenmoleküle auf die Trennsäule. So lassen sich auch mit 30 m Trennsäulen gute Trennergebnisse erzielen wie in Abbildung 2.42 zu sehen. Alle 11 HAAs können innerhalb von 30 min getrennt werden.

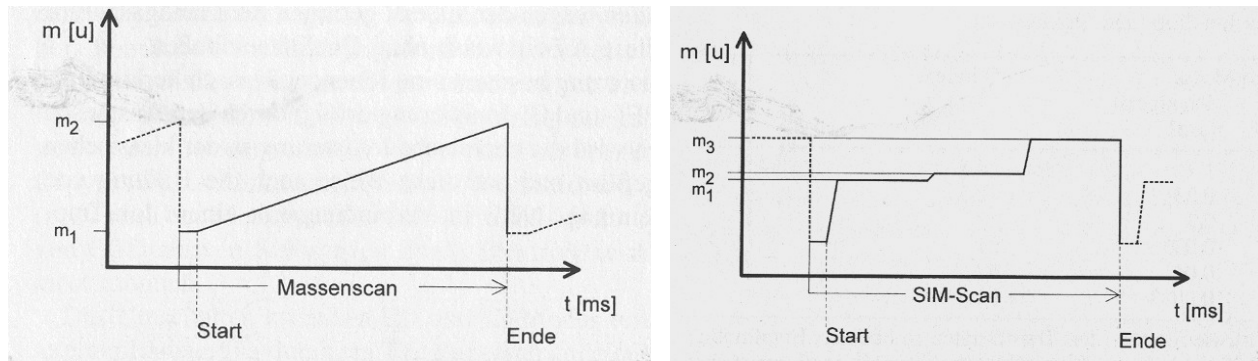


**Abbildung 2.42**

GC-Quadrupol-MS-Trennung (EI) einer mit MTBSTFA silylierten HAA-Standardlösung (5 µg HAA/ml, vgl. 6.9.6); Injektion (Pulsed Split/splitless) 1 µl; Trennung: 30 m Quarzkapillare DB-5.625 (5 % Phenyl-, 95 % Methylsilikon, cross-linked), 0,32 mm i. Ø, 0,25 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. 6.8.5.4 Abschnitt III; Trägergas Helium 3 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus 200 u bis 400 u; Harman (1), Norharman (2), IQ (3), IQx (4), MeIQx (5), 7,8-DiMeIQx (6), 4,8-DiMeIQx (7), MeIQ (8), 4,7,8-TriMeIQx (9), PhIP (10), MeAαC (11).

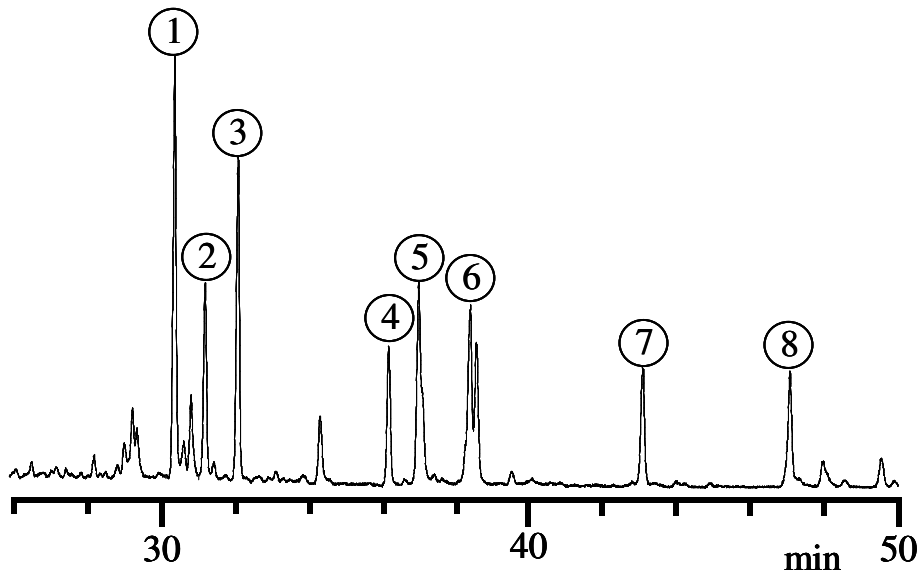
Wie bereits in Kapitel 2.3.7.5, Abschnitt III, Buchstabe c) besprochen, ist bei der Elektronenstoßionisation (EI) für alle tert.-Butyldimethylsilylderivate der HAAs die Abspaltung des tert.-Butylrestes charakteristisch. Das entstandene Hauptfragment  $[M-57]^+$  ist jeweils eindeutig als stärkstes Fragment zu erkennen (vgl. Abb. 2.37). Daher ist es sinnvoll, im Selected-Ion-Monitoring (SIM)-Modus das jeweilige Fragment  $[M-57]^+$  zu detektieren. Der Vorteil des SIM-Modus besteht darin, dass Matrixstörungen ausgeblendet werden können. Dadurch, dass wenige Massen detektiert werden müssen, erhöht sich die Messzeit pro Masse, auch „dwell time“ genannt, gegenüber einer kontinuierlichen Detektion im SCAN-Modus, wie in Abbildung 2.43 schematisch zu sehen.

In den eigenen Arbeiten wurde standardmäßig im SIM-Modus bei der EI auf die Massen  $m/e = 255$  (IQ),  $m/e = 256$  (IQx),  $m/e = 269$  (MeIQ),  $m/e = 270$  (MeIQx),  $m/e = 284$  (4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx),  $m/e = 298$  (4,7,8-TriMeIQx) und  $m/e = 281$  (PhIP) gescannt. Eine Reduzierung auf jeweils eine Masse in einem festgelegten engen Zeitfenster des jeweiligen HAAs brachte keine weitere Empfindlichkeitssteigerung. Da im SIM-Modus Störungen aus der Matrix zumeist ausgeblendet werden können, konnte eine Verkürzung der Aufarbeitung, die lediglich in einer salzsaurer Extraktion mit anschließender Isolierung der HAAs durch eine alkalische Flüssig/Flüssig- Verteilung mit Dichlormethan besteht (vgl. Arbeitsvorschrift,

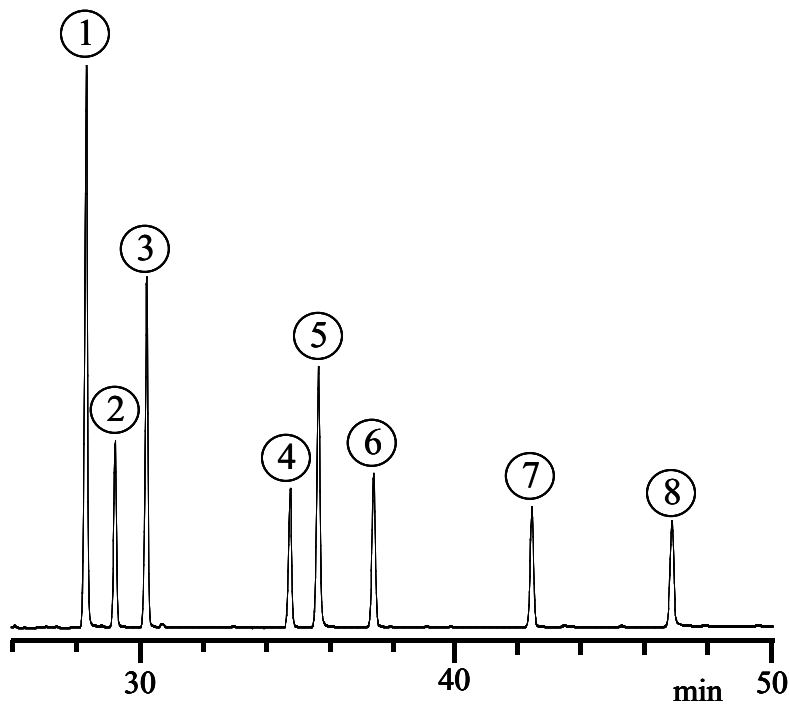
**Abbildung 2.43**

Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs im SCAN- bzw. SIM-Modus; kontinuierliche Detektion der Massen von  $m_1$  bis  $m_2$  im Zeitfenster (links); diskontinuierliche Detektion von bestimmten, ausgewählten Massen  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  (rechts)

Kapitel 6.7.2 und Kapitel 6.7.4), erreicht werden. Wie in Abbildung 2.44 zu erkennen, sind im SCAN-Lauf im entsprechenden Chromatogramm noch viele weitere, aus der Matrix Rindfleischreaktionsaroma stammende Störungen durch von der Kapillarsäule koeluierende mitderivatisierte Verbindungen ersichtlich. Wird die Probe im SIM-Modus vermessen, so sind in den zugehörigen Chromatogrammen fast ausschließlich scharf getrennte Peaks der jeweiligen HAAs zu erkennen (vgl. Abb. 2.45).

**Abbildung 2.44**

GC-Quadrupol-MS-Trennung (EI) eines dotierten Extraktes aus käuflichem Rindfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. Kapitel 6.7.2 bis Kapitel 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. Kapitel 6.9.6); Injektion (pulsed Split/splitless) 1  $\mu$ l; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i.  $\varnothing$ , 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. Kapitel 6.8.5.4 Abschnitt I; Trägergas Helium 1,9 ml/min, Gerätekombination vgl. Kapitel 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230  $^{\circ}$ C, Quadrupol 150  $^{\circ}$ C, SEV 1576 V, Scan-Modus 200 u bis 400 u; IQ (1), IQx (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), MeIQ (5), 4,8-DiMeIQx (6), 4,7,8-TriMeIQx (7), PhIP (8)



**Abbildung 2.45**

GC-MS-ITD-Trennung eines dotierten Extraktes aus käuflichem Rindfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. Kapitel 6.7.2 bis Kapitel 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. Kapitel 6.9.6); Injektion (pulsed Split/splitless) 1 µl; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 mm Filmstärke; Temperaturprogramm vgl. Kapitel 6.8.5.4 Abschnitt I; Trägergas Helium 1,9 ml/min, Gerätekombination vgl. Kapitel 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, SIM-Modus IQ (1, m/z = 255), IQx (2, 256), MeIQx (3, 270), 7,8-DiMeIQx (4, 284), MeIQ (5, 269), 4,8-DiMeIQx (6, 284), 4,7,8-TriMeIQx (7, 298), PhIP (8, 281)

Durch eine chemische Ionisation unter Zuhilfenahme von Reaktandgasen wie Methan (hart) und Ammoniak (weich) (Grundlagen und entsprechender Geräteaufbau siehe Kapitel 2.3.7.3 Abschnitt IV) kann die Zahl entstehender Fragmente reduziert werden. Bei der Positiven und Negativen Chemischen Ionisation (PCI und NCI) erfolgt die Fragmentierung mittels eines Reaktandgases zumeist unter Anlagerung bzw. Abspaltung eines Wasserstoffions. So entstehen durch CI aus dem jeweiligen Molekül die so genannten Quasi-Molekülonen  $[M+H]^+$  bzw.  $[M-H]^-$ . In den Abbildungen 2.46 und 2.47 sind beispielhaft die Fragmentierungen von MeIQx (Molekulargewicht: 327) bei der NCI mit Ammoniak und der PCI mit Ammoniak dargestellt.

Da dieses Quasi-Molekülon unfragmentiert vorliegt, eignet sich diese Ionisationsmethode besonders für die quantitative Bestimmung von per GC nachweisbaren Analyten.

In Tabelle 2.5 ist die Intensitätsverteilung vom TBDMS-Derivat des MeIQx nach positiver chemischer Ionisation mit Methan verzeichnet. Hierbei werden die Analytmoleküle durch die in der Ionisationskammer des GC-Quadrupol-MS mittels Elektronenbeschuss des Methans erzeugten  $CH_5^+$ -Ionen protoniert. Es entstehen die Quasi-Molekülonen.

Neben dem Quasi-Molekülpeak  $[M+H]^+$  mit der Intensität 100 kann man zum einen eine geringe Fragmentierung des TBDMS-Derivates von MeIQx beobachten (Abspaltung einer Methyl- bzw. einer tert.-Butyl-Gruppe), denn  $CH_5^+$ -Ionen bewirken eine sogenannte harte Chemische Ionisation. D. h., diese Ionen sind in der Lage, durch Stoß hohe Energie auf die entstandenen Analytmoleküle zu übertragen, sodass diese fragmentieren.

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
368	2,5	$[M+41]^+$
358	2,1	$[M+29]^+$
357	4,9	
356	17,8	
329	24,2	
328	100,0	$[M+H]^+$
327	47,1	
326	3,9	
313	2,7	
312	8,8	
311	1,1	
272	3,7	$[M-57]^+$
271	8,9	
270	12,1	
269	1,8	

Tabelle 2.6

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-PCI mit Methan von mit MTBSTFA derivatisiertem MeIQx (vgl. Kapitel 6.9.6), GC-MS-Parameter siehe Abb. 6.8.5.6

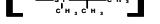
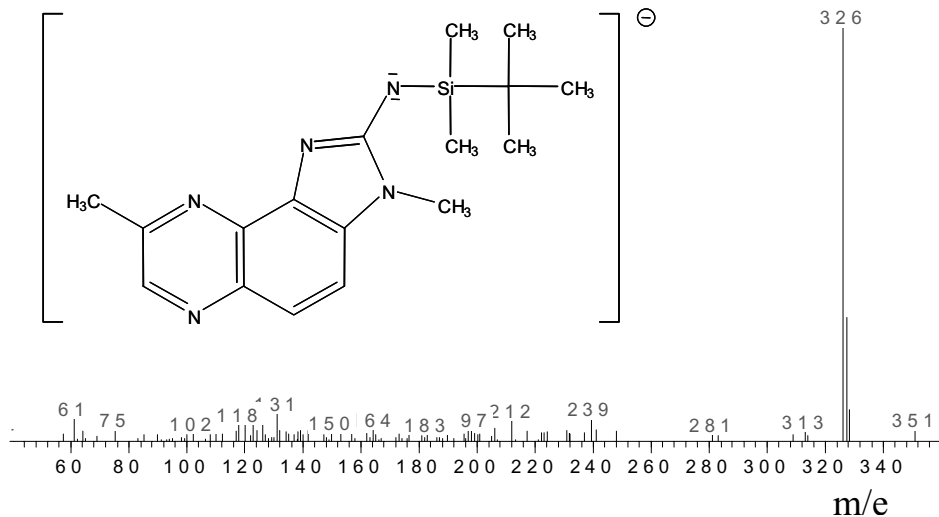
Ionisierungsmethode	MS-Parameter			Hauptfragment = 100%	weitere Fragmente
	Temperatur der Ionenquelle	Temperatur des Quadrupol	zugeführtes CI-Gas		
Elektronenstoßionisation	230 °C	150 °C	./.	$[M- ]^+$ 	$[M]^+$ (17%) $[M-15]^+$ (4%)
Positive Chemische Ionisation	250 °C	106 °C	Methan 4.0 0,25 ml/min	$[M+H]^+$	$[M-C_2H_5]^+$ (18%) $[M-C_3H_5]^+$ (2,5%) $[M-15]^+$ (8%)
Positive Chemische Ionisation	250 °C	106 °C	Methan 4.0 0,9 ml/min	$[M+H]^+$	$[M-C_2H_5]^+$ (17%) $[M-C_3H_5]^+$ (17%)
Positive Chemische Ionisation	250 °C	106 °C	Ammoniak 3.8W 1 ml/min	$[M+H]^+$	$[M-NH_4]^+$ (10%)
Negative Chemische Ionisation	150 °C	106 °C	Ammoniak 3.8W 2 ml/min	$[M-H]^-$	keine weiteren Fragmente

Tabelle 2.6

Vergleich unterschiedlicher Ionisierungstechniken am GC-Quadrupol-MS

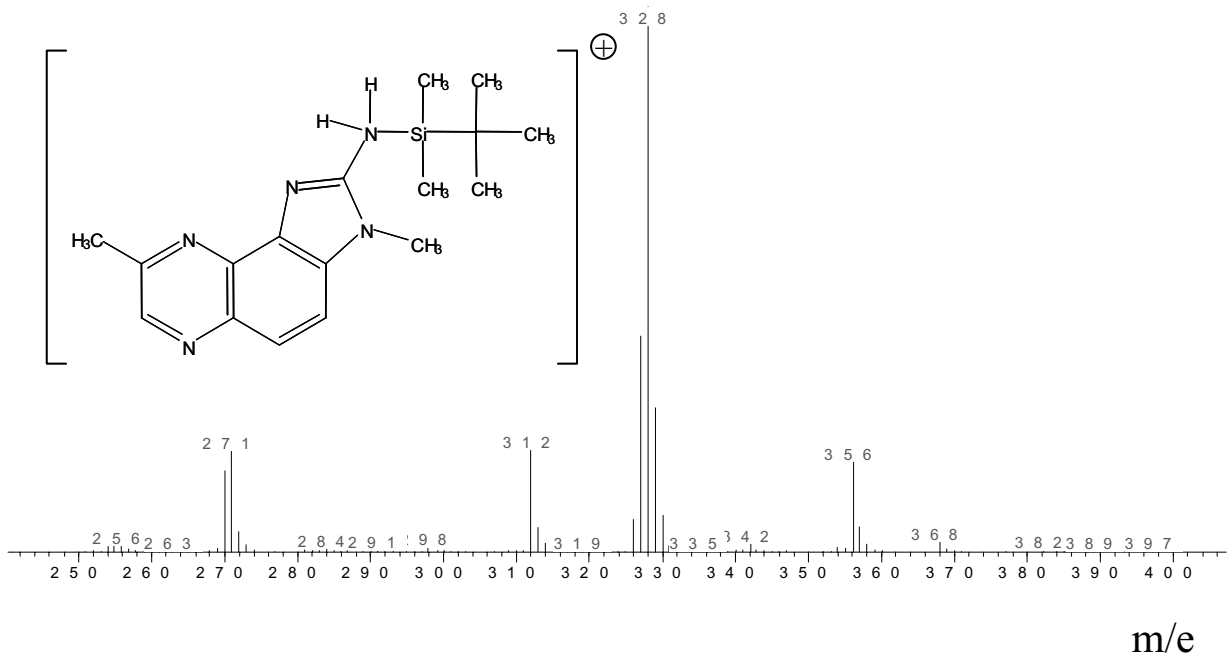
Zum anderen lässt sich anhand der Fragmente  $[M+29]^+$  und  $[M+41]^+$  darauf schließen, dass sich geladene Reaktandgasmoleküle an das derivatisierte MeIQx anlagern. Dabei handelt es sich dabei um die durch Elektronenbeschuss von Methan innerhalb der Ionisierungskammer entstandenen  $C_2H_5^+$  - (Massenverschiebung +29) und  $C_3H_6^+$ -Ionen (Massenverschiebung +41).

Eine Zusammenfassung der in den eigenen Arbeiten optimierten Ionisierungsvarianten ist in Tabelle 2.6 zu sehen.



**Abbildung 2.46**

Massenspektrum von mit MTBSTFA silyliertem MeIQx (vgl. Kapitel 6.9.6) nach negativer chemischer Ionisation (NCI) mit Ammoniak,  $[M-1]^- = 326$ ; Geräteparameter vgl. Kapitel 6.8.5.1 Nr. 3, Trennparameter siehe Kapitel 6.8.5.7



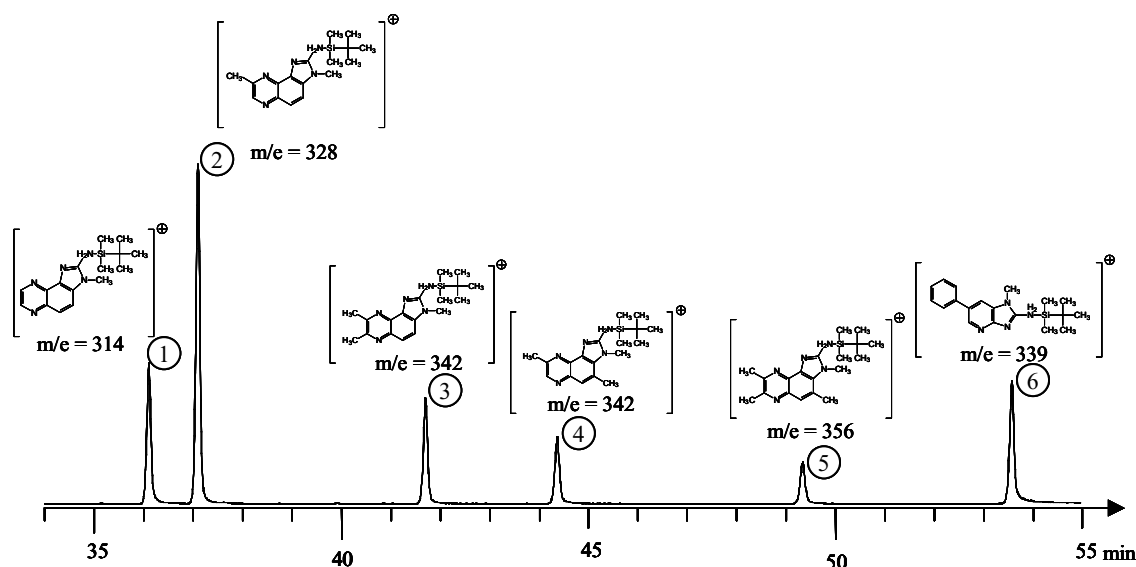
**Abbildung 2.47**

Massenspektrum von mit MTBSTFA silyliertem MeIQx (vgl. Kapitel 6.9.6) nach positiver chemischer Ionisation (PCI) mit Ammoniak,  $[M+1]^+ = 328$ ; Geräteparameter vgl. Kapitel 6.8.5.1 Nr. 3, Trennparameter siehe Kapitel 6.8.5.6

Des Weiteren wurde mit Ammoniak als Reaktandgas sowohl im PCI- als auch im NCI-Modus gearbeitet (vgl. Abb. 2.47 und 2.48). Ammoniak ist ein so genanntes weiches Ionisierungsgas. Aus der Ionisierung des Reaktandgases entstehen primär  $\text{NH}_3^+$ - und  $\text{NH}_2^+$ -Ionen, die durch



Stoß weitere Ammoniak-Moleküle zum  $\text{NH}_4^+$ -Ion ionisieren können. Diese  $\text{NH}_4^+$ -Ionen sind zwar in der Lage, Analytmoleküle zu protonieren; sie sind jedoch zu energiearm, um die Analytmoleküle zu ionisieren. Neben den Quasi-Molekülonen der entsprechenden HAAs konnten in den eigenen Arbeiten die aus Anlagerung des  $\text{NH}_4^+$ -Ions entstandenen  $[\text{M}+18]^+$ -Fragmente nachgewiesen werden. Für die Bestimmung der HAAs mittels GC-MS-PCI mit Ammoniak ist es sinnvoll, im SIM-Modus die jeweiligen Massen der Quasimolekülonen zu detektieren. Eine entsprechende GC-Analyse am Beispiel einer mit HAAs dotierten Rindfleischreaktionsaromenprobe ist in Abbildung 2.48 zu sehen.

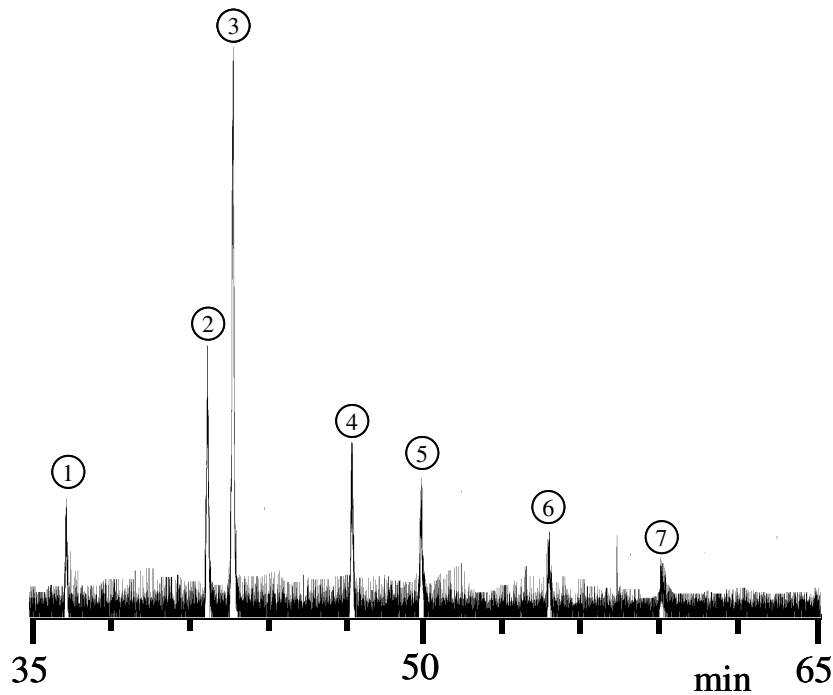


**Abbildung 2.48**

GC-Quadrupol-MS-Trennung nach positiver chemischer Ionisation mit Ammoniak eines dotierten Extraktes aus käuflichem Rindfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. Kapitel 6.7.2 bis Kapitel 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. Kapitel 6.9.6); Injektion (pulsed Split/splitless) 1  $\mu\text{l}$ ; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i.  $\text{O}$ , 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. Kapitel 6.8.5.6; Trägergas Helium 1,0 ml/min, Gerätekombination vgl. Kapitel 6.8.5.1, Ionenquelle 250  $^{\circ}\text{C}$ , Quadrupol 106  $^{\circ}\text{C}$ , SEV 1576 V, SIM-Modus; IQx (1), MeIQx (2), 7,8-DiMeIQx (3), 4,8-DiMeIQx (4), 4,7,8-TriMeIQx (5), PhIP (6)

Bei der NCI mit Ammoniak sind ausschließlich  $\text{NH}_2^-$ -Ionen für die Protonenabstraktion am Azomethin-N der derivatisierten HAAs verantwortlich. Hierbei entstehen negativ geladene Quasi-Molekülonen ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ). Ein Nachteil der NCI ist, dass geringste Spuren von Verunreinigungen mit hoher Elektronenaffinität ( $\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , etc.) zu einem hohen Hintergrundrauschen führen (vgl. Abb 2.49).

Da ein erhöhtes Hintergrundrauschen die Lebensdauer der Filamente und des Sekundärionenvervielfachers reduziert, ist es sinnvoll, bei Bestimmung von HAAs mittels GC-MS-NCI mit Ammoniak nur im SIM-Modus zu messen.



**Abbildung 2.49**

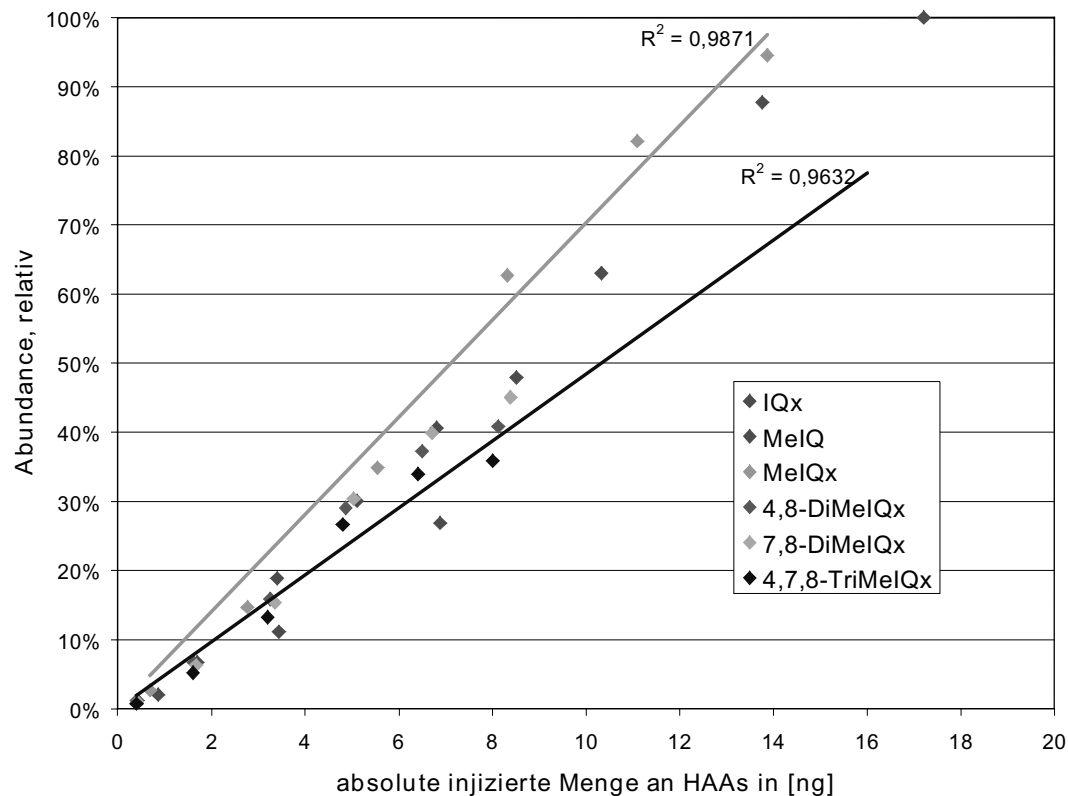
GC-Quadrupol-MS-Trennung nach negativer chemischer Ionisation mit Ammoniak eines dotierten Extraktes aus käuflichem Rindfleischreaktionsaroma (100 ng HAA/g, Aufarbeitung vgl. Kapitel 6.7.2 bis Kapitel 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. Kapitel 6.9.6); Injektion (pulsed Split/splitless) 1 µl; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. Kapitel 6.8.5.7; Trägergas Helium 1,0 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionenquelle 150 °C, Quadrupol 106 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus; Norharman (1), IQx (2), MeIQx (3), 7,8-DiMeIQx (4), 4,8-DiMeIQx (5), 4,7,8-DiMeIQx (6), PhIP (7)

### III. Test auf Robustheit der beschriebenen Derivatisierungsmethoden an Realproben bei der Bestimmung von HAAs als tert.-Butylsilylether mittels GC-MS-EI und GC-MS-PCI

Entscheidend für die Robustheit einer Methode ist die Linearität über einen weiten Konzentrationsbereich sowie die Abhängigkeit der Linearität von der Matrix.

In den eigenen Arbeiten wurde die Linearität der Bestimmung von HAAs als tert.-Butyldimethylsilyl-Derivate in Abhängigkeit von der Konzentration, der Matrix und der gewählten Ionisierungsart bei der GC-MS-Analyse untersucht.

Dabei wurde vereinfacht das Ergebnis der linearen Regression von injizierter Menge der einzelnen HAAs in Bezug auf die Stärke des aufgenommenen Signals (Abundance, relativ), wie in Abbildung 2.50 für die GC-MS-EI-Bestimmung von HAAs in Standardlösungen, betrachtet.

**Abbildung 2.50**

Mittlerer Linearitätsbereich verschiedener HAAs bei der Bestimmung der entsprechenden TBDMS-Derivate mittels GC-MS-EI (matrixfrei); Auswertung im SIM-Modus über das Fragment  $[M-57]^+$

Tabelle 2.7 zeigt den Korrelationskoeffizienten  $R^2$  in Bezug auf die gewählte Matrix in Abhängigkeit von der verwendeten GC-MS-Bestimmungsmethode und den ausgewählten Analyten. Als Matrices wurden Rindfleischreaktionsaroma (abgek.: Rind), Hühnerfleischreaktionsaroma (abgek. Huhn) und Hefehydrolysat (abgek. Hefe) eingesetzt. Bei den HAAs MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx wurden mittels GC-MS die entsprechenden TBDMS-Derivate nach Elektronenstoßionisation (GC-MS-EI, vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.8.5.4 Abschnitt I), nach Positiver Chemischer Ionisation mit Methan (GC-MS-CI(CH<sub>4</sub>), vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.8.5.5) und nach Positiver Chemischer Ionisation mit Ammoniak (GC-MS-CI(NH<sub>3</sub>), vgl. Arbeitsvorschrift Kapitel 6.8.5.6) bestimmt.

Anhand der Korrelationskoeffizienten (vgl. Tabelle 2.7) ist ersichtlich, dass die Bestimmung als TBDMS-Derivate mittels GC-MS nach Positiver Chemischer Ionisierung mit Ammoniak für die Bestimmung der HAAs unter den getesteten GC-MS-Methoden die geeignetste ist.

Die Nachweisgrenze (Signal-Rausch-Verhältnis von 3:1) für die Bestimmung der HAAs in Realproben mittels GC-MS-CI(NH<sub>3</sub>) wurde auf 50 ng HAAs pro ml Probelösung geschätzt. Die Bestimmungsgrenze bei dieser Methode lag bei 200 ng HAAs pro ml Probenlösung. Dies entspricht bei den in eigenen Arbeiten gewählten Einwaagen für die Extraktion, Isolierung

Methode	Analyt	Korrelationskoeffizient ( $R^2$ )		
		Rind	Huhn	Hefe
GC-MS-EI	MeIQx	0,9877	0,9877	0,9877
	4,8-DiMeIQx	0,9418	0,9574	0,9538
	7,8-DiMeIQx	0,9700	0,9700	0,9700
GC-MS-CI(CH <sub>4</sub> )	MeIQx	0,9206	0,9356	0,9648
	4,8-DiMeIQx	0,9179	0,9410	0,9622
	7,8-DiMeIQx	0,9194	0,9322	0,9583
GC-MS-CI(NH <sub>3</sub> )	MeIQx	0,9901	0,9889	0,9910
	4,8-DiMeIQx	0,9804	0,9892	0,9905
	7,8-DiMeIQx	0,9799	0,9854	0,9899

**Tabelle 2.7**

Überblick über die Korrelationskoeffizienten verschiedener in den eigenen Arbeiten benutzter Methoden

und Aufreinigung (vgl. Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.7) sowie den bei der Derivatisierung verwendeten Volumina an Lösungsmittel und Derivatisierungsreagenz (vgl. Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.9.6) einer Bestimmungsgrenze von 8 ng/g Probe. Die Bestimmung ist bis 200 µg HAAs pro ml Probenlösung – entsprechend 8 µg/g Probe – linear. Die Wiederholbarkeit der Methode für die Analytik der HAAs im Spurenbereich war sehr gut; denn die Variationskoeffizienten von dotierten Proben mit niedrigem (24 ng HAAs/g Probe) und hohem Gehalt an HAAs (800 ng HAAs/g Probe) lagen bei nur 5,4 % bzw. 4,0 %.

### **3 Untersuchungen zur Bildung von Maillard-Produkten und heterocyclischen aromatischen Amininen (HAAs) in wasserarmen Avicel-Modellsystemen**

Pentosen sind in Fleisch und Fleischprodukten in größerer Menge enthalten als in anderen Lebensmitteln. Ferner werden Pentosen als aromafördernde Zusätze bei der Herstellung von so genannten Reaktionsaromen eingesetzt. Da in den Lebensmitteln freie Aminosäuren vorliegen bzw. bei der Herstellung solcher Aromen eingesetzt werden, können zahlreiche Reaktionswege der Maillard-Reaktion zur Bildung erwünschter und unerwünschter Folgeprodukte führen.

Da bei der Erhitzung von Fleisch und Fleischprodukten sowie bei der Herstellung von Reaktionsaromen HAAs entstehen, deren Bildung mit der Maillard-Reaktion verknüpft ist, ist es wichtig zu wissen, inwieweit Pentosen und deren im Rahmen der Maillard-Reaktion entstandene reaktive Abbauprodukte die Bildung der HAAs beeinflussen. Deshalb besteht ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen zur Beeinflussung der Bildungsrate von HAAs durch Intermediate und Abbauprodukte aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen anhand von Avicel-Modellsystemen.

#### **3.1 Einsatz von Modellsystemen**

Veränderungen in der Zusammensetzung von wasserarmen kohlenhydratreichen Lebensmitteln während der Verarbeitung und Lagerung werden oft durch die nicht-enzymatische Bräunungsreaktion (Maillard-Reaktion) bewirkt. Besonders bei Trocknungsprozessen sind starke chemische Veränderungen zu erwarten, da während der Trocknung ein vom Wassergehalt abhängiges Maximum der Maillard-Reaktion durchlaufen wird. Oft reagieren Intermediate und Abbauprodukte aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion bei (nachgeschalteten) Erhitzungsprozessen mit verschiedenen Komponenten des Lebensmittels. Wie bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben, können in fleischhaltigen Lebensmitteln, die neben den Guanidinen Kreatin und Kreatinin auch noch freie Aminosäuren wie Glycin und reduzierende Zucker oder deren Abbauprodukte enthalten, heterocyclische aromatische Amine (HAAs) auch bei Erhitzungstemperaturen weit unterhalb der Pyrolysetemperatur entstehen (vgl. Kapitel 1.1.3). Untersuchungen über das Vorkommen von HAAs in verarbeiteten und nicht verarbeiteten Lebensmitteln finden sich häufig in der Literatur (vgl. Kapitel 1.1.2 und Übersichtsartikel von Eisenbrand et al. [Lit. 45], Layton et al. [Lit. 150] und Skog [Lit. 268]). Möglichkeiten zur

Minimierung der Bildung von HAAs sind dabei lediglich durch Änderung der küchentechnologischen Praxis, insbesondere durch die Wahl der Erhitzungsart und -dauer, gegeben. In komplex zusammengesetzten Lebensmitteln bzw. Lebensmittelgrundstoffen wie z. B. Fleischextrakt und Reaktionsaromen (genaue Definition in Kapitel 3.8.1) sind die Verarbeitungsschritte und die damit einhergehenden stofflichen Veränderungen mannigfaltig. Die Maillard-Reaktion in Kombination mit der Bildung von HAAs stellt nur einen Teil-Reaktionskomplex in der Gesamtheit der möglichen chemischen Veränderungen im entsprechenden Lebensmittel dar.

Deshalb werden in den eigenen Arbeiten Modellsysteme definierter Zusammensetzung eingesetzt, um die Beeinflussung der Bildungsrate von HAAs durch Intermediate und Abbauprodukte aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen in Ansätzen klären zu können.

Modellsysteme, welche die zu betrachtenden, komplex zusammengesetzten Lebensmittel und wichtige Rezepturbestandteile von Lebensmitteln bezüglich ihrer Zusammensetzung, Lagerung und technologischen Weiterverarbeitung nachahmen, bieten den Vorteil einer überschaubaren Matrix und damit eine erleichterte quantitative Bestimmung von HAAs und geeigneten Markerverbindungen. Weiterhin ergibt sich durch eine gezielte Lenkung der Reaktionsbedingungen und geeignete Wahl der chemischen Zusammensetzung der Vorteil, dass die gebildeten Mengen der zu betrachtenden Analyten in Modellsystemen häufig weitaus höher sind als in Lebensmitteln. Dies ermöglicht vor allem eine genaue Identifizierung neuer Verbindungen sowie einen präzisen Nachweis bekannter Analyten durch UV-Spektroskopie, definierte Massenfragmentierungen und charakteristische Signale bei NMR-Messungen. Im Sinne der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit ist es wichtig zu wissen, ob eine zuge setzte Verbindung oder Verbindungsklasse die Bildung von HAAs fördert oder hemmt. In Modellsystemen kann dieser Nachweis überschaubar geführt werden, ohne dass weitere untereinander komplex vernetzte Reaktionen Aussagen verzerren oder nur vage Deutungsansätze ermöglichen.

Die Einfachheit von Modellsystemen birgt jedoch den Nachteil, dass sich die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe in Modellsystemen nur bedingt nachvollziehen lässt. Daher muss eine direkte Übertragbarkeit auf konkrete Lebensmittel im Einzelfall geprüft werden. Modellsysteme sind bereits in vielen Arbeiten beschrieben worden. Daher ist es sinnvoll, Erkenntnisse aus diesen Arbeiten in eine gezielte Herstellung der Modellsysteme, in die Wahl geeigneter Lagerungsbedingungen sowie in die Wahl eines praxisnahen Erhitzungsverfahrens mit einfließen zu lassen, um noch unbekannte Wechselwirkungen

und Abhängigkeiten durch Veränderung einzelner Parameter beobachten und klären zu können. Als Beispiele für praxisnahe Erhitzungs- und Verarbeitungsverfahren können das Braten von Fleisch sowie die Gewinnung und Herstellung von Fleischextrakt genannt werden.

In den Arbeiten von Schuirmann [Lit. 246] werden – wie bereits in Kapitel 1.1.4 beschrieben – die Zeit/Temperaturabhängigkeit der Bildung von HAAs in wasserarmen Modellen, der Einfluss des Wassergehaltes sowie der grundlegende Einfluss der Modellzusammensetzung eingehend untersucht. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse dienen als Grundlage zur Festlegung der Modellzusammensetzung in den eigenen Untersuchungen an wasserarmen Modellsystemen.

### **3.1.1 Bisher untersuchte Modellsysteme zur Klärung der Bildung von HAAs**

Bei Forschungsarbeiten zu den Bildungswegen von HAAs und zum Einfluss von Zusammensetzung und Verarbeitungsparametern auf die Entstehung dieser unerwünschten Kontaminanten nutzten zahlreiche Arbeitsgruppen Modellsysteme, die einem für die Entstehung der HAAs notwendigen Erhitzungsprozess unterzogen werden. Schon früh wurden Modellsysteme zu Klärung der HAA-Bildung in wasserarmen Lebensmitteln eingesetzt. Im Folgenden werden die bisher verwendeten Modellsysteme kurz vorgestellt, die Anwendbarkeit für die eigene Fragestellung geprüft und die mögliche Umsetzung in den eigenen Arbeiten dargestellt.

#### **3.1.1.1 Grundsätzlicher Aufbau der Modellsysteme**

An Pyrolysemodellen wurden erste Untersuchungen zur Bildung von HAAs von Nagao et al. [Lit. 201] und Sugimura et al. [Lit. 277] durchgeführt. Der Pyrolysevorgang findet dabei bei Temperaturen oberhalb von 300 °C statt. Die bei Pyrolyseansätzen gebildeten HAAs wie Tryp-P-1, Glu-P-1, Phe-P-1, AαC und MeA entstehen unter den sonst üblichen Koch- und Brattemperaturen (100 °C bis 300 °C) von zubereiteten Lebensmitteln noch nicht. Gegenstand der eigenen Untersuchungen sind die bei diesen praxisüblichen Verarbeitungstemperaturen gebildeten HAAs.

Zur Klärung des Bildungsmechanismus von HAAs untersuchten Jägerstad et. al [Lit. 112] die Kruste mit unterschiedlichen Mengen von Glucose bzw. Kreatinin dotierter gebratener Fleischstücke. Hierfür wurden diese vor dem Bratprozess mit wässriger Zucker- und/oder Kreatininlösung besprüht.

gefundenes HAA	Zucker-komponente	Aminosäure	Gehalt HAAs in [nmol/mol Kreatinin]	Literatur
IQ	Fru	Gly	1,0	Grivas et al., 1986 [Lit. 72]
MeIQ	Fru –	Ala Phe	nb 3,0	Grivas et al., 1986 Felton und Knize, 1990
MeIQx	Glc	Gly	4,4	Jägerstad et al, 1984 [Lit. 116]
	Fru	Gly	6-7	Grivas et al., 1986
	Glc	Gly	4	Skog et al., 1990 [Lit. 263]
	Glc	Phe	nb	Skog und Jägerstad, 1991 [Lit. 262]
	Glc	Ala	0,9	Muramatsu und Matsushima, 1985 [Lit. 196]
	Rib	Ala	1,8	Muramatsu und Matsushima, 1985
	Glc	Thr	nb	Negishi et al., 1985 [Lit. 208]
	Rib	Lys	4,2	Muramatsu und Matsushima, 1985
4,8-DiMeIQx	Glc	Gly	nb	Skog et al., 1990
	Fru	Ala	1,9-2,6	Grivas et al., 1985
	Glc	Ala	4,2	Muramatsu und Matsushima, 1985
	Rib	Ala	1,5	Muramatsu und Matsushima, 1985
	Glc Rib	Thr Lys	nb 26,1	Negishi et al., 1985 Muramatsu und Matsushima, 1985
7,8-DiMeIQx	Glc	Gly	1,1	Negishi et al., 1984
	Glc	Gly	nb	Lee et al., 1992 [Lit. 154]
PhIP	Glc	Phe	3,6	Shioya et al., 1987
	Glc	Phe	20,9	Skog und Jägerstad, 1991
	–	Phe	6,4	Skog und Jägerstad, 1991

**Tabelle 3.1**

Überblick über bisher publizierte kreatininhaltige Modellsysteme auf der Basis von Lösungen in Diethylenglykol-Wasser-Mischungen zur Klärung der Bildung von HAAs (nb = nicht bestimmbar, da unterhalb der Bestimmungsgrenze)

Ein weiteres, von dieser Arbeitsgruppe erstmals im Jahr 1983 zur Manifestierung der „Las-Vegas-Hypothese“ (vgl. Kapitel 1.1.3) angewandtes Modellsystem bestand aus wässrigen Lösungen von Zuckern, Kreatinin und den Aminosäuren Glycin und Alanin in Mischung mit Diethylenglykol. Dabei betrug das Verhältnis von Wasser zu Diethylenglykol 1:5 (v/v). Bei



diesen Modell-Lösungen kann der pH-Wert variiert werden. Darüber hinaus können Reaktionstemperaturen oberhalb von 100 °C gewählt werden. Die vom Verhältnis von Diethylenglykol zu Wasser abhängige Siedetemperatur bestimmt dabei die Reaktionstemperatur.

In den darauffolgenden Jahren gewannen derartige Modellsysteme zunehmend an Interesse. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten bisher publizierten Modellsysteme dieser Art und die dabei gebildeten Mengen an HAAs.

Um Temperaturen oberhalb des Siedepunktes des Wassers bei Normaldruck zu erreichen, können auch wässrige Lösungen in druckfesten Behältnissen aus Stahl oder dickwandigem Glas erhitzt werden. In den Arbeiten von Johansson [Lit. 120] wurden zahlreiche auf dieser Basis hergestellte Modellsysteme mit unterschiedlichen Zusätzen untersucht. Einen Überblick über den Einsatz derartiger geschlossener wässriger Modellsysteme gibt Tabelle 3.2.

gefundenes HAA	Zuckerkomponente	Aminosäure	Gehalt HAAs in [nmol/mol Kreatinin]	Literatur
IQx	Glc	Gly	3,3	Johansson et al., 1995 [Lit. 117]
MelQx	Glc	Gly	7-10	Skog and Jägerstad, 1993 [Lit. 261]
	Glc	Gly	3,6	Johansson et al., 1995
	Glc	Leu	2,4	Johansson et al., 1995
	Glc	Lys	7,7	Johansson et al., 1995
	Glc	Thr	9,0	Skog and Jägerstad, 1993
4,8-DiMelQx	Glc	Gly	0,3	Johansson et al., 1995
	Glc	Ala	0,7	Johansson et al., 1995
	Glc	Phe	nb	Skog und Jägerstad, 1991 [Lit. 262]
PhIP	Glc	Phe	7,3	Johansson et al., 1995
	Glc	Gal	0,006 *	Manabe et. al, 1992 [Lit. 172]
	Rib	Phe	0,020*	Manabe et. al, 1992
	Rib	Phe	0,020**	Manabe et. al, 1992
Norharman	Glc	Phe	nb	Johansson et al., 1995
Harman	Glc	Phe	nb	Johansson et al., 1995

**Tabelle 3.2**

Überblick über bisher publizierte kreatininhaltige Modellsysteme, erhitzt in druckfesten Behältnissen zur Klärung der Bildung von HAAs

(nb = nicht bestimmbar, da unterhalb der Bestimmungsgrenze, \* nur 60 °C über 6 Wochen,

\*\* nur 37 °C über 6 Wochen)

Mit wässrigen offenen oder geschlossenen Modellsystemen lassen sich zwar grundlegende Zusammenhänge zwischen Zusammensetzung, Temperatur und Bildungsrate von HAAs in der Reaktionslösung ermitteln; jedoch unterscheiden sich Erhitzungsprozesse in wässriger Matrix grundlegend von denen in wasserarmer und trockener Matrix. In diesem Zusammen-

hang sind insbesondere die unterschiedliche Wärmeübertragungsrate und die gegenläufigen Effekte zum einen der besseren Beweglichkeit einerseits und der stärkeren Hydratisierung der Reaktanden in wässrigen Modell-Lösungen andererseits zu nennen. Hydratisierte Reaktanden können unter Umständen nicht so leicht in die Bildungsreaktion eingehen. Andererseits laufen wichtige technologische Prozesse wie das Braten von Fleisch, das Eindicken von Fleischextrakt und die Herstellung von Trockensuppen und Reaktionsaromen unter Verminderung des Wassergehaltes ab bzw. finden im wasserarmen Milieu statt.

Daher verwenden einige Arbeitsgruppen Modellsysteme, bei denen die Reaktanden ohne weitere Matrix trocken erhitzt werden. Einen Überblick gibt Tabelle 3.3.

gefundenes HAA	Zuckerkomponente	Aminosäure	Gehalt HAAs in [nmol/mol Kreatinin]	Literatur
IQ	Glc	Phe	13,5	Felton und Knize, 1990 [Lit. 52]
	–	Ser	3,7	Knize et al., 1988 [Lit. 141]
	–	Phe	3,0	Felton und Knize, 1990
	–	Pro	0,4	Yoshida et al., 1984 [Lit. 330]
IQx	–	Ser	2,7	Knize et al., 1988
MelQx	–	Ala	nb	Övervik et al., 1989 [Lit. 219]
	–	Ser	nb	Övervik et al., 1989
	–	Tyr	nb	Övervik et al., 1989
PhIP	Glc	Phe	560	Negeshi et al., 1985 [Lit. 208]
	–	Phe	735	Negeshi et al., 1985
	–	Leu	nb	Övervik et al., 1989

**Tabelle 3.3**

Überblick über bisher publizierte wasserarme bzw. trockene kreatininhaltige Modellsysteme zur Klärung der Bildung von HAAs

Ein aktuelles Beispiel trocken erhitzter Modellsysteme findet man in den Arbeiten von Richling [Lit. 235]. Sie untersuchte den Einfluss von Erhitzungstemperatur und –zeit sowie von der Rohstoffzusammensetzung, speziell von Aminosäuren und Zuckern, auf die Bildungsrate von HAAs. Die Zusammensetzung der Modellsysteme war der von industriell hergestellten Reaktionsaromen nachgeahmt. Die verwendeten Modellsysteme wiesen eine einheitliche Grundzusammensetzung auf. Die Grundmischung bestand aus gleichen molaren Anteilen Glucose, Xylose, Cystein und Glutaminsäure. Zu dieser Grundmischung wurden andere Rohstoffe wie Fleischextrakt, Fischextrakt, Hefeextrakt in pastöser Form und Sojasauce jeweils einzeln hinzugegeben. Anschließend wurde das jeweilige homogenisierte Gemisch bei defi-

nierten Temperaturen eine entsprechende Zeit erhitzt und die Menge der gebildeten HAAs bestimmt.

Bei dieser Art von nahezu wasserfreien trockenen Modellsystemen, wie sie von Richling eingesetzt wurden, werden mögliche Veränderungen (Wassergehalt, Bildung reaktiver Zwischenstufen) während einer definierten Lagerung, die die Bildungsrate von HAAs zusätzlich beeinflussen können, nicht berücksichtigt. Aufgrund des geringen Wasseranteils findet in diesen Modellen die Maillard-Reaktionen nur in beschränktem Maße statt.

Die Beeinflussung der Bildungsrate von HAAs durch Intermediate und Abbauprodukte aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen kann nur dann ermittelt werden, wenn diese reaktiven Maillard-Reaktionsprodukte in den Modellsystemen in größerem Maße entstehen. So ist in wasserarmen Systemen erfahrungsgemäß anzunehmen, dass die Bildung von Produkten der frühen Maillard-Reaktion besser gesteuert und ihre Reaktionsweise bei der Bildung von HAAs genauer untersucht werden kann.

### 3.1.1.2 Mögliche Grundkomponenten eines wasserarmen Modellsystems

Grundkomponenten eines wasserarmen Modellsystems zur Klärung des Einflusses der Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen auf die Bildungsrate von HAAs müssen – in Anlehnung an den von Jägerstad et al. vorgeschlagenen und vielen weiteren Arbeiten zugrundegelegten Bildungsweg (vgl. Kapitel 1.1.3) – eine Guanidin- und eine Aminosäurekomponente sowie ein reduzierender Zucker bzw. ein aus diesem resultierendes Maillard-Abbauprodukt sein.

Als mögliche Guanidinkomponenten können insbesondere Kreatin, Kreatinin und Arginin verwendet werden.

Gesichert ist, dass ohne Kreatinin keine Bildung von HAAs in Lebensmitteln und Modellsystemen stattfindet. Bei Erhitzungsprozessen von Fleisch und fleischhaltigen Proben wird Kreatin in Kreatinin umgewandelt [Lit. 107, 279]. Das Vorliegen von Kreatinin ist zwar notwendig für die HAA-Bildung, stellt aber keinen ausbeutebegrenzenden Faktor dar. Sowohl in Modellsystemen als auch in zubereitetem Fleisch ist es nach der Erhitzung noch fast vollständig vorhanden, da anteilmäßig nur wenig Kreatinin im Rahmen der in Modellsystemen ablaufenden Maillard-Reaktion umgesetzt wird (vgl. Publikationen von Schuirmann [Lit. 246], Laser Reuterswärd et al. [Lit. 149] und Skog et al. [Lit. 263]).

Mehrere Veröffentlichungen, in denen eine mutagene Aktivität über den Ames-Test auch in erhitzten Getreideerzeugnissen nachgewiesen wurde, weisen darauf hin, dass Kreatinin mög-

licherweise durch Arginin ersetzt werden kann. In umfangreichen Arbeiten konnten Knize et al. [Lit. 136] zwar die mutagenen Aktivitäten von argininhaltigen Modellsystemen auf Diethylenglykol/Wasser-Basis mit bestimmtem Zusätzen an Aminosäuren und Zuckern bestätigen; HAAs, die direkt für die Mutagenität verantwortlich gemacht werden könnten, ließen sich jedoch nicht nachweisen. In ihren Arbeiten setzte Richling [Lit. 235] in Trockenmischungen aus Glucose, Glycin, Alanin und Phenylalanin entweder Arginin oder Kreatin ein. Im Gegensatz zu dem kreatinhaltigen Modell wurden im argininhaltigen Modell keine HAAs gebildet. Daher erscheint es nicht sinnvoll, Arginin als Guanidino-Komponente einzusetzen.

Untersuchungen von Övervik et al. [Lit. 219] zeigten, dass zahlreiche Aminosäuren auch in zuckerfreien, trockenen Modellsystemen in äquimolarer Mischung mit Kreatinin bei Erhitzung auf 200 °C für 60 min im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA98 durchweg eine mutagene Aktivität entwickelten. In verschiedenen Modellansätzen konnten in entsprechenden Mischungen von Kreatinin mit den Aminosäuren Serin, Threonin, Phenylalanin, Alanin, Leucin und Tyrosin einzelne HAAs identifiziert werden. Mögliche, in Abwesenheit von reduzierenden Zuckern zur Bildung der HAAs führende Reaktionswege sind bisher jedoch noch nicht geklärt worden.

Der Schwerpunkt der eigenen Arbeiten liegt in der Klärung des Einflusses von Abbauprodukten der Maillard-Reaktion – speziell der von Pentosen – auf die Bildungsrate von HAAs (vgl. Problemstellung und Zielsetzung, Kapitel 1.2). Die tatsächliche Art und Menge bestimmter in kohlenhydratreichen Matrices während des Erhitzens gebildeter HAAs unter Einbeziehung vieler Aminosäuren kann nicht immer in Übereinstimmung mit gängigen Bildungshypothesen wie z. B. dem Bildungspostulat von Jägerstad gebracht werden. Daher ist es bei einer derartigen Fragestellung sinnvoll, diejenigen Aminosäuren zu verwenden, die bereits vielfach in kohlenhydratreichen Modellsystemen Einsatz gefunden haben und deren Reaktionsweise im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Bildungsmechanismen geklärt ist.

Jägerstad und Reuterswärd (1983, [Lit. 111]) erhitzen Glucose und bestimmte Aminosäuren unter Rückfluss zwei Stunden lang auf 130 °C zusammen mit Kreatinin in einer Wasser-Diethylenglykollmischung (auch DEG-Modelle genannt; Mischungsverhältnis 1:6, v/v). Bei der Verwendung von Threonin ergab sich im Ames-Test mit TA98 nach S9-Aktivierung (vgl. Kapitel 2.2) die höchste mutagene Aktivität, gefolgt von Glycin und Lysin. Modellmischungen mit Prolin, Glutaminsäure, Alanin und schwefelhaltigen Aminosäuren wiesen nur geringe mutagene Aktivitäten auf. In analog aufgebauten und behandelten Modellsystemen, bei denen die Aminosäurekomponente durch verschiedene Proteingemische ausgetauscht wurde,

konnten Jägerstad und Reuterswärd keine mutagene Aktivität nachweisen. Somit wurde von ihnen klargestellt, dass nur beim Einsatz freier Aminosäuren mutagene Verbindungen gebildet werden. Alle untersuchten Aminosäuren kommen in freier Form in Fleisch und zum Teil in weiterverarbeiteten Produkten wie Fleischextrakten vor. Alanin und Glycin sind neben Carnosin Hauptbestandteile der Aminosäure-Fraktion von Fleisch und Fleischextrakt. In weiteren Jahren wurden daher häufig Modellsysteme mit Glycin und Alanin eingesetzt, um die Bildungsmechanismen der HAAs näher zu beleuchten. So konnte Jägerstad in Zusammenarbeit mit japanischen Wissenschaftlern in DEG-Modellsystemen oben genannter Grundzusammensetzung MeIQx [Lit. 116] und 7,8-DiMeIQx [Lit. 207] nachweisen. Aus einem ansonsten gleich zusammengesetzten Modell mit Alanin als Aminosäure konnten Grivas et al. [Lit. 71] neben Spuren von MeIQ auch 4,8-DiMeIQx isolieren und nachweisen.

Arbeiten zu möglichen Bildungsmechanismen von HAAs wie die von Nyhammar [Lit. 214] formulieren die Bildung von MeIQx und 4,8-DiMeIQx in glycin- und alaninhaltigen Lebensmitteln und Modellsystemen über 2,5-Dimethylpyrazin, Formaldehyd und Acetaldehyd. Diese Verbindungen sind Zwischenprodukte, entstanden durch den Streckerabbau von Aminosäuren unter Beteiligung entsprechender Intermediate (vgl. Kapitel 1.1.2). Die Bildung von 2,5-Dimethylpyrazin ist über verschiedene intermediäre Zwischenstufen denkbar (vgl. Dissertation Nyhammar [Lit. 215]). Sie ist stark abhängig von den jeweiligen Reaktionsbedingungen. Die bisherigen Erkenntnisse aus dem Reaktionsverhalten der Hexosen bei der Bildung von HAAs sollen in den eigenen Arbeiten auf das Reaktionsverhalten von Pentosen und Pentoseabbauprodukten übertragen werden. Dabei ist es sinnvoll, sowohl glycin- als auch alaninhaltige Modellansätze unter gleichen Reaktionsbedingungen im Hinblick auf die HAA-Bildung zu untersuchen. In den eigenen Arbeiten wird primär Glycin als Aminosäurekomponente eingesetzt. Die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse wird an Modellsystemen mit Alanin geprüft.

### 3.1.2 Vorteile von Modellsystemen auf Avicel-Basis

Die eingesetzten wasserarmen Modellsysteme beruhen auf mikrokristalliner Cellulose als Trägermatrix. Avicel ist der allgemeine Handelsname für mikrokristalline Cellulose, die aufgrund ihrer chemischen Struktur ein völlig unlösliches Polymer darstellt. Bei zunehmendem Wassergehalt kommt es so nur zu einer geringfügigen Quellung, wodurch die Viskosität und damit der Diffusionswiderstand in den Modellen kaum erhöht wird. Des Weiteren wird die Struktur des Avicels bei den gewählten Reaktionsbedingungen kaum verändert. In Vorversuchen lassen sich auch bei Erhitzung von mit wenig Wasser beladenem Avicel auf über 200 °C

keine Bräunungsprozesse, die aus Reaktionen von Zersetzungs- und Spaltprodukten resultieren könnten, feststellen. Nach dieser Erhitzung liegt der Gehalt an kurzkettigen Oligosacchariden sowie Glucose nur geringfügig über den in der Herstellerspezifikation angegebenen Höchstgehalten.

Werden wasserarme Modellsysteme auf Avicel-Basis, die nur Kreatinin und Glycin oder Alanin enthalten, auf über 100 °C erhitzt, so lassen sich bereits geringe Mengen an HAAs, speziell MeIQx, nachweisen. Dies kann von Kritikern als Einflussnahme des Avicels auf die Bildungsreaktionen von HAAs aufgrund fehlender Inertheit angesehen werden. Hierbei muss aber darauf hingewiesen werden, dass neben dem in Kapitel 1.1.3 dargestellten Bildungsmechanismus, ausgehend von reduzierenden Zuckern, Kreatinin und Aminosäuren, weitere Bildungswege diskutiert werden. Verschiedene Publikationen unterschiedlicher Autoren zeigen dies auf. Exemplarisch sind in diesem Zusammenhang die Arbeiten von Yoshida et al. [Lit. 350], Övervik et al. [Lit. 219] und Taylor et al. [Lit. 284] zu nennen. Ihre Untersuchungen ergaben, dass nur Aminosäuren und Kreatinin, nicht aber Zucker für die Bildung von HAAs notwendig sind. Es ist auch bekannt, dass Aminosäuren, speziell Hydroxy-Aminosäuren, bei der trockenen Erhitzung Pyrazinderivate bilden (vgl. Wang und Odell [Lit. 310]). Diese Pyrazin- sowie auch Pyridinderivate sind hinsichtlich ihrer Reaktivität und ihres Reaktionsverhaltens mit den im Laufe der Maillard-Reaktion gebildeten methylsubstituierten Pyrazinen und Pyridinen vergleichbar. Im Falle einer Beteiligung der Maillard-Reaktion an der HAA-Bildung reagieren diese mit den aus den betreffenden Aminosäuren gebildeten Strecker-Aldehyden zu Vinylpyrazinen und -pyridinen, die sich dann mit Kreatinin zu den entsprechenden IQ-Verbindungen umsetzen. Die in Abwesenheit von reduzierenden Zuckern ablaufenden Reaktionsmechanismen sind jedoch noch nicht bekannt. Bei den Untersuchungen an wasserarmen kreatinin- und aminosäurehaltigen Modellsystemen muss also beachtet werden, dass ein Teil der gebildeten HAAs über den oben beschriebenen alternativen Bildungsweg entsteht.

Der Vorteil des Einsatzes von Avicel ist neben der geringfügigen Quellung und der chemischen Inertheit in der Homogenität dieses Trägermaterials zu sehen. Das handelsübliche Avicel (research grade) ist standardisiert und in genau definierter Korngröße erhältlich. Einzusetzende Reaktanden können in Wasser gelöst und mit dem Trägermaterial innig zu einem gleichmäßig viskosen Brei vermengt werden. Nach einer Gefriertrocknung kann das beladene Avicel leicht gemörsert und gesiebt werden. Die fertige Modellmischung weist somit eine einheitliche Kornstruktur auf, welche die Einstellung auf eine einheitliche Gleichgewichtsfeuchtigkeit im gesamten Probenmaterial erleichtert (vgl. Kapitel 3.4.1).

### 3.1.3 Lagerung von Modellsystemen auf Avicel-Basis

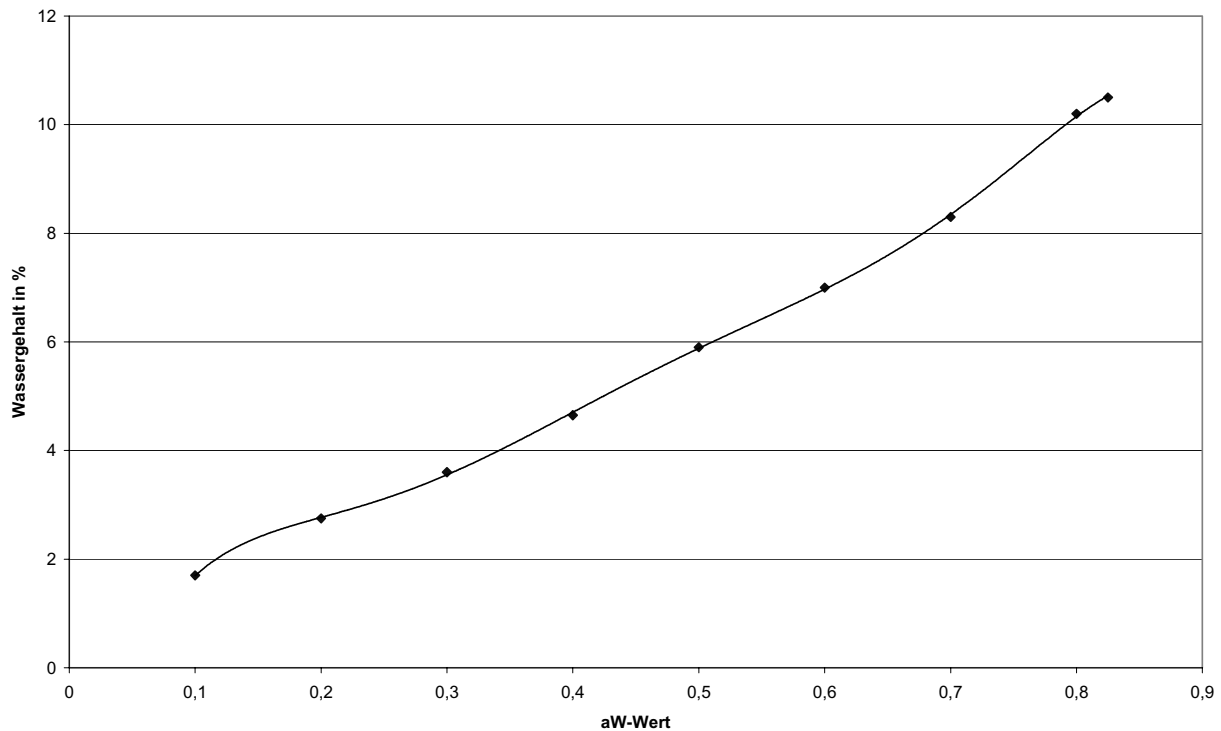
Da in wasserarmen Systemen die Reaktionsgeschwindigkeit nicht direkt vom Wassergehalt, sondern von der Wasseraktivität beeinflusst wird, ist es notwendig, diese während einer gewissen Lagerungszeit konstant zu halten. Die Wasseraktivität, die auch als Gleichgewichtsfeuchtigkeit ausgedrückt wird, stellt nach Gleichung 3.1 den Quotienten aus dem Wasserdampfpartialdruck im Modell bzw. Lebensmittel und dem Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers bei gegebener Temperatur dar. Die Beziehung zwischen dem Wassergehalt und der Wasseraktivität eines Lebensmittels bei konstanter Temperatur ist durch die Sorptionsisotherme gekennzeichnet. Bei wasserarmen Systemen haben kleine Änderungen des Wassergehaltes meist starke Veränderungen in der Wasseraktivität zur Folge. Damit kommt der Wasseraktivität eine zentrale Bedeutung zu.

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

- $a_w$ : Wasseraktivität  
 $p$ : Wasserdampfpartialdruck im Lebensmittel  
 $p_0$ : Sättigungsdampfdruck des reinen Wassers  
 $\varphi$ : Gleichgewichtsfeuchte

#### Gleichung 3.1

Sorptionsisothermen gehören zu den festen physikalischen Charakteristika einer Substanz bzw. eines Substanzgemisches. In geeigneter Literatur wie dem Handbook of Food Isotherms [Lit. 108] sind auch Sorptionsisothermen für mikrokristalline Cellulose (Avicel) und unterschiedliche Gemische mit Avicel als Hauptkomponente aufgeführt. Abbildung 3.1 zeigt die dort verzeichnete Sorptionsisotherme für reines Avicel. Der für viele Lebensmittel typisch sigmoide Verlauf ist hierbei nicht so stark ausgeprägt. Eine entsprechende Sorptionsisotherme für Avicel-Kohlenhydratgemische ist nicht verfügbar, kann aber leicht durch Messung des Wassergehaltes nach der Vakuumtrockenschrankmethode (vgl. Arbeitsschritt Kapitel 6.6.1.2) und Ermittlung der tatsächlichen Wasseraktivität unter Zuhilfenahme eines justierten  $a_w$ -Meters (vgl. Arbeitsschritt Kapitel 6.6.1.3) selbst ermittelt werden. Die Wasseraktivität in den verwendeten Avicelmodellen wird durch Lagerung der gefriergetrockneten Reaktionsmischungen in Exsikkatoren über gesättigten Salzlösungen eingestellt (siehe Kapitel 6.6.1.1). Diesen Salzlösungen können nach Rockland [Lit. 236] über das Löslichkeitsprodukt verschiedene Gleichgewichtsfeuchten bzw. Wasseraktivitäten zugeordnet werden. Die Wasseraktivität ( $a_w$ ) ist über die Gleichung 3.1 mit der relativen Gleichgewichtsfeuchtigkeit ( $\varphi$ ) verbunden, die mit der relativen Luftfeuchtigkeit der Umgebung im Gleichgewicht steht.



**Abbildung 3.1**

Sorptionsisotherme für mikrokristalline Cellulose (Avicel) aus: Handbook of Food Isotherms, 1982

Gemäß ihren Sorptionsisothermen lassen sich gemörserte und gesiebte Modellsysteme durch Lagerung bis zur Gewichtskonstanz in drei bis vier Tagen auf die gewünschte Gleichgewichtsfeuchtigkeit einstellen. Die Wasseraufnahme kann über die Vakuumtrockenschrankmethode (vgl. Kapitel 6.6.1.2) bestimmt und so die abgeschlossene Einstellung der Probe auf einen bestimmten  $a_W$ -Wert nachgeprüft werden.

Tabelle 3.4 zeigt die relativen Luftfeuchtigkeiten verschiedener Salzlösungen nach Rockland sowie die in den eigenen Arbeiten sich einstellenden Wassergehalte von Xylose-Glycin-Kreatinin-Modellsystemen in Prozent. Bei geringfügig anders zusammengesetzten Modellsystemen werden u. U. von den verzeichneten Werten abweichende Mengen an Wasser aufgenommen. Zur Charakterisierung der Reaktionswege bei der thermischen Behandlung einfacher kreatinin-, aminosäure- und pentosehaltiger Modellansätze über Bräunungsmessungen (siehe Kapitel 3.4.1) und verschiedene Abfangexperimente mit ortho-Phenylendiamin (OPD), bei denen reaktive Zwischenstufen der Maillard-Reaktion (Dicarbonyle) in entsprechende Derivate überführt werden (siehe Kapitel 3.4.2), werden die verschiedenen Modellansätze bei unterschiedlichen  $a_W$ -Werten gelagert, um neben dem Einfluss der Zusammensetzung und der Erhitzungstemperatur auch den Einfluss der Wasseraktivität auf den Ablauf der Maillard-Reaktion zu ermitteln.



Gesättigte Salzlösung von	Relative Luftfeuchtigkeit bei 20 °C (%)	Ermittelte Wassergehalte (in %) der Modellsysteme
Lithiumchlorid	12	0,8
Kaliumacetat	23	1,4
Magnesiumchlorid	33	1,9
Kaliumcarbonat	44	2,5
Magnesiumnitrat	52	3,3
Natriumchlorid	75	5,9
Kaliumchromat	88	9,0
Zinksulfat	91	10,3

**Tabelle 3.4**

Relative Luftfeuchtigkeit verschiedener Salzlösungen bei 20 °C (nach Rockland [Lit. 236])/sich einstellende Wassergehalte der Xylose-Avicel-Modellsysteme (Bestimmung nach Kapitel 6.6.1.2)

So soll in dieser Arbeit über genauere Kenntnis dieser Reaktionswege der Reaktionsablauf bei der Bildung von HAAs in verschiedenen zusammengesetzten, Pentose und Pentoseabbauprodukte enthaltenden Modellsystemen beschrieben und somit vielleicht auch besser vorhersagbar werden können. Dies ist nach bisherigen Erkenntnissen noch nicht möglich.

Modellsysteme, bei denen nach Erhitzung und definierter Aufarbeitung ausschließlich der Gehalt an HAAs bestimmt werden soll, werden bei einem einheitlichen  $a_w$ -Wert von 0,75 gelagert (vgl. Kapitel 3.5 bis Kapitel 3.8), da bei diesem  $a_w$ -Wert die höchste Reaktionsfähigkeit besteht, wie Schuirmann [Lit. 246] in seinen Arbeiten zum Einfluss des Wassergehaltes bzw. der Wasseraktivität auf die Bildungsgeschwindigkeit der HAAs beschreibt. Er untersuchte Avicel-Modellsysteme aus Fructose, Glycin und Kreatinin, die bei unterschiedlichen  $a_w$ -Werten gelagert wurden, nach zweistündiger Erhitzung bei 120 °C auf ihren Gehalt an MeIQx. Mit ansteigendem Wassergehalt zeigte sich eine Zunahme des Gehaltes an MeIQx. Schuirmann vermutete eine größere Reaktivität bei höheren Wassergehalten aufgrund eines erleichterten Transportes wasserlöslicher Reaktanden. Die Einstellung eines relativ hohen  $a_w$ -Wertes ist anzustreben, da aufgrund der Bildung größerer Mengen an HAAs eindeutigere Aussagen möglich sind.

Wie in Kapitel 1.1.2 aufgeführt, traten besonders bei Fleischextrakten und Reaktionsaromen hohe Gehalte an HAAs auf. Gründe hierfür kann man in verschiedenen industriellen Verarbeitungsschritten von Fleischextrakten sehen, bei denen die Ausgangsmaterialien von einem Ausgangswassergehalt von 20 % nach Vermischen mit weiteren Komponenten über bis zu 5 Stunden – zuletzt im Vollvakuum bei Temperaturen um 100 °C – auf einen Wassergehalt von 2 % bis 3 % heruntergetrocknet werden. Auch bei Herstellungsverfahren von so genannten Zubereitungsaromen des Maillardtyps werden häufig, wie von Nutt [Lit. 213] beschrieben,

entsprechende Ausgangssubstanzen in wässriger Suspension bei 110 °C bis 130 °C max. 60 min lang erhitzt und sprühgetrocknet. Bei beiden Verfahren wird ein Bereich mittleren Wassergehaltes durchlaufen, in dem die Maillard-Reaktion mit einem ausgeprägten Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit in den Vordergrund tritt [Lit. 161]. Bei einem  $a_w$ -Wert von 0,75 befindet man sich im wassergehaltsabhängigen Maximum der Maillard-Reaktion (Eichner und Heiss [Lit. 88]).

Da die Bildung von HAAs mit der Maillard-Reaktion nach den bekannten, von verschiedenen Autoren postulierten Bildungswegen gekoppelt ist, ist es sinnvoll, die Modellsysteme beim Maximum der Maillard-Reaktion (bei  $a_w = 0,75$ ) zu lagern.

### **3.2 Auswahl der Komponenten der in den eigenen Arbeiten verwendeten Modellsysteme**

Wie in Kapitel 1.1 bereits ausgeführt, sind im Allgemeinen reduzierende Zucker, Aminosäuren und Kreatinin als Grundkomponenten für die Bildung von HAAs erforderlich. Hauptziel der eigenen Untersuchungen an Modellsystemen ist die Erforschung der Rolle von Pentosen und der im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten Abbauprodukte von Pentosen auf die Bildung von HAAs. Als Aminokomponenten wurden in den eigenen Arbeiten die Aminosäuren Glycin und Alanin verwendet.

#### **3.2.1 Pentosen und ihre Folgeprodukte als Reaktionspartner bei der Bildung von HAAs**

Mit dem Ziel, das Ausmaß der Maillard-Reaktion zur Beurteilung von Qualitätsveränderungen von Lebensmitteln bestimmen zu können, waren Amadori-Verbindungen Schwerpunkt zahlreicher Untersuchungen [Lit. 60]. Amadori-Verbindungen entstehen aus einer nucleophilen Addition einer Aminokomponente an die Carbonylgruppe einer Pentose oder Hexose, wobei über ein Glykosylamin unter Enolisierung 1-Amino-1-desoxyketosen entstehen (vgl. Kapitel 1.1.1.1). Entsprechende N-(1-Desoxy-pentulos-1-yl)amine sind lediglich von Hashiba [Lit. 80] umfangreich beschrieben worden. Amadori-Verbindungen sind aufgrund ihrer Labilität wichtige Vorstufen für die Bildung von weitere Folgereaktionen eingehenden Desoxyaldosen und Desoxyketosen. Die Bildung einer 3-Desoxypentosulose in Pentose/Amino-Umsetzungen konnte im Jahr 1993 erstmals von Kato [Lit. 126] durch den Nachweis als entsprechendes Chinoxalinderivat gezeigt werden. Hingegen ist es Nedvidek et al. [Lit. 205] erst kürzlich gelungen, die bisher postulierte Existenz von 1-Desoxy-2,3-pentodiulose

(1-Desoxyoson von Pentosen) als Folgeprodukt einer entsprechenden Amadori-Verbindung abzusichern.

Aus dem hitzeinduzierten Abbau von 3-Desoxypentosulosen im Rahmen der Maillard-Reaktion entsteht durch Enolisierungen, Wasserabspaltungen und Cyclisierungen Furan-2-aldehyd. Bei größeren Mengen an Glycin im Reaktionsgemisch kann auch 2-(Formylpyrrol-1-yl)-essigsäure bzw. bei größeren Mengen an Alanin 2-(Formylpyrrol-1-yl)-propionsäure entstehen. Daneben unterliegen die 1-Desoxyosone der Pentosen einem schnellen Abbau zu Folgeprodukten. Ein Hauptabbauprodukt ist das Norfuraneol. Der Abbau der 1- und 3-Desoxyosone verläuft jedoch nicht zwangsläufig unter Erhaltung des intakten Kohlenstoffgerüsts [Lit. 60]. Durch Retroaldol- und Diketospaltung entstehen bei Pentosen u. a. Reaktionsprodukte wie Glyoxal, Methylglyoxal, Hydroxy-2-propanon (Hydroxyaceton) und Butan-2,3-dion (Diacetyl). Die Folgeprodukte des Abbaus von Pentosen im Rahmen der Maillard-Reaktion können dann zu einer Vielzahl aroma-, geschmacks- und farbaktiver Verbindungen weiterreagieren.

Zur Klärung der zur Bildung von HAAs führenden Reaktionswege muss auch die Reaktivität der im Verlauf der Maillard-Reaktion von Pentosen gebildeten, meist aus Carbonylverbindungen bestehenden Abbauprodukte untersucht werden. Für diese Untersuchungen wurden insbesondere die aus intermediären Amadori-Verbindungen gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen (Oson, Desoxyosone) sowie deren Folgeprodukte Furan-2-aldehyd, Norfuraneol, Methylglyoxal und Hydroxyaceton eingesetzt. Ein Teil der im Reaktionszyklus gebildeten Intermediate und deren Folgeprodukte ist käuflich nicht erhältlich und muss daher in präparativen Modellansätzen, die in Kapitel 3.3 beschrieben sind, hergestellt werden. Um den Einfluss der Heyns-Umlagerungsprodukte von Hexosen (vgl. Kapitel 1.1.1) auf die Bildung von MeIQ zu zeigen, benutzte Schuirman [Lit. 246] ein Modellsystem, in denen diese Umlagerungsprodukte in situ erzeugt wurden. Dazu erhitzte er zunächst ein Avicel-Modellsystem mit Fructose und Glycin, jedoch ohne Kreatinin, 90 min auf 70 °C und fügte dem so vorbehandelten Modellsystem anschließend wässrige Kreatininlösung hinzu, um es daraufhin gefrierzutrocknen und die dann bei weiterer Erhitzung gebildeten Mengen an MeIQ zu analysieren. In den eigenen Arbeiten konnte diese in-situ-Bildung von reaktiven Zwischenstufen der Maillard-Reaktion und die Untersuchung ihrer Reaktionsweise nicht auf die vorliegenden, Xylose enthaltenden Modelle übertragen werden, da in entsprechenden Modellsystemen weder Amadori-Verbindungen noch Strecker-Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten.

Bisher wurden von Muramatsu und Matsushima [Lit. 196] lediglich Ribose-Aminosäure-Kreatinin-Mischungen in Diethylenglykol-Wasser-Modellsystemen auf die Bildung von HAAs hin untersucht. Es konnten aus alanin- und lysinhaltigen Modellsystemen MeIQx und 4,8-DiMeIQx sowie aus phenylalaninhaltigen Modellsystemen Spuren an 4,7,8-TriMeIQx nachgewiesen werden. Yen et al. [Lit. 328] stellten im Verlauf der Erhitzung eine Unterdrückung der Bildung von MeIQx in Kreatinin, Glycin und Glucose enthaltenden Modellsystemen durch Xylose-Lysin-Maillard-Reaktionsprodukte (MRP) fest. Hierbei wurden dem Modellsystem keine speziellen MRP wie Melanoidine oder sonstige Bräunungsprecursoren (vgl. Kapitel 3.2.1) zugefügt, sondern es wurde lediglich eine weiter nicht aufgereinigte, nach Erhitzung von Xylose und Lysin im wässrigen gepufferten Medium erhaltene Maillard-Reaktionsmischung zugesetzt. Genauen Aussagen über einzelne mögliche Reaktionswege können nicht getroffen werden; es kann nur über die Menge der gebildeten HAAs eine wenig spezifische Einflussnahme einer undefinierten Mischung verschiedener Abbauprodukte von Pentosen auf die Bildungsrate der HAAs festgestellt werden. Außerdem sind Diethylenglykol-Wasser-Modellsysteme, wie bereits ausgeführt, nicht realitätsnah.

Ausgehend von den beschriebenen Beobachtungen erscheint es lohnend, die Reaktionsweise von Xylose und ihrer im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehenden Folgeprodukte hinsichtlich der Bildung von HAAs näher zu untersuchen.

### 3.2.2 Weitere Komponenten der Modellsysteme

Um den noch unbekanntem Einfluss von Pentosen und Pentoseabbauprodukten auf die Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen zu klären, wurden in den eigenen Arbeiten neben den absoluten Gehalten an HAAs auch versucht, weitere bei der Lagerung und Erhitzung gebildete Reaktionsprodukte als mögliche Reaktanden bei der HAA-Bildung bzw. als Begleitprodukte zu erfassen. Daher wurden zusätzlich zu einem Avicel-Modellsysteme zur Erfassung des Bräunungsverhaltens (Analyseverfahren siehe Kapitel 3.4.1) und zum anderen Avicel-Modellsysteme, denen ortho-Phenylendiamin (OPD) als Abfangreagenz zur Erfassung intermediär gebildeter  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zugesetzt wurde (Analyseverfahren siehe Kapitel 3.4.2), eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung und Herstellung dieser Modellsysteme ist aus Gründen der Übersichtlichkeit erst im Rahmen der Interpretation der jeweiligen Ergebnisse in Kapitel 3.5.1 bzw. Kapitel 3.5.2 beschrieben.

Der Hauptschwerpunkt der eigenen Arbeiten liegt in der Beschreibung der HAA-Bildungsrate anhand von wasserarmen Avicel-Modellsystemen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung

und den Reaktionsbedingungen. Diese Bildungsrate wird maßgeblich durch die gewählte Erhitzungstemperatur und –dauer des jeweiligen Modellansatzes bestimmt. Überlegungen zu der Auswahl der Modellkomponenten sind in Kapitel 3.2 bereits ausgeführt worden. Bezüglich der Zusammensetzung wurden drei Kategorien von Modellsystemen zur Erfassung der Bildungsrate von HAAs bearbeitet. Die Menge der mit dem Avicel vermischten Modellkomponenten entspricht ungefähr ihrem Gehalt in realen wasserarmen Lebensmitteln bzw. Lebensmittelgrundbestandteilen.

In einer ersten Kategorie werden so genannte Einkomponentensysteme eingesetzt. Der Begriff „Einkomponentensystem“ ist nicht in Hinblick auf die einzelnen Reaktionspartner zu sehen, sondern auf die Wahl einer einzigen Kohlenhydratkomponente bzw. Carbonylkomponente. Neben Kreatinin werden als Aminosäurekomponenten Glycin (Kapitel 3.6.1 bis Kapitel 3.6.4) oder Alanin (Kapitel 3.7) sowie als Kohlenhydratkomponente Xylose oder bevorzugt entstehende Abbauprodukte der Xylose (im weiteren Carbonylkomponenten genannt) eingesetzt. Dies geschieht zum einen in unterschiedlichen Molmengenverhältnissen zu äquimolaren Mischungen von Kreatinin und Glycin (Kapitel 3.6.1 bis Kapitel 3.6.3), zum anderen werden die Modellkomponenten in dem für die Bildung der HAAs optimalen molaren Verhältnis von Kreatinin, Aminosäure und Carbonylkomponente von 1:1:0,5 (vgl. Kapitel 1.1.3) auf das Avicel aufgezogen. Dies geschieht im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Erhitzungstemperaturen auf die HAA-Bildungsrate in Kreatinin-Glycin-Modellsystemen, die entsprechende Carbonylverbindungen enthalten (Kapitel 3.6.4). Bei allen durchgeführten Modellreihen wird zum Vergleich zusätzlich ein Kreatinin-Aminosäure-Glucose-Modellsystem in die Untersuchung einbezogen.

Mit Kreatinin und Glycin enthaltenden Modellsystemen, denen Xylose bzw. die Carbonylkomponenten in unterschiedlichen Molmengenverhältnisse zugesetzt werden, kann geklärt werden, ob diese Komponenten ebenso einen ambivalenten Einfluss auf die Bildung von HAAs haben, wie es von zahlreichen Mono- und Disacchariden bereits bekannt ist. Versuche mit unterschiedlichen Erhitzungstemperaturen ermöglichen Rückschlüsse darauf, bei welcher Temperatur die Carbonylkomponenten beginnen, eine HAA-Bildung zu bewirken. Ferner kann untersucht werden, inwieweit sich das Reaktionsverhalten hinsichtlich Art und gebildeter Menge an HAAs verändert.

Schuirmann [Lit. 246] untersuchte die Bildung von MeIQx in wasserarmen Avicelmodellsystemen aus Fructose/Glucose, Glycin und Kreatinin in Abhängigkeit von der Temperatur. Eine Temperaturerhöhung bewirkte einen fast exponentiellen Anstieg an gebildetem MeIQx.

Für die beiden Kohlenhydrate Fructose und Glucose ergaben sich dabei keine wesentlichen Unterschiede im Reaktionsverhalten.

In einer zweiten Kategorie werden Zweikomponentensysteme eingesetzt (vgl. Kapitel 3.8). Der Begriff „Zweikomponentensystem“ ist nicht in Hinblick auf die einzelnen Reaktionspartner zu sehen, sondern auf die Wahl einer binären Mischung aus reduzierenden Zuckern bzw. Carbonylverbindungen als Reaktionspartner. Hierbei besteht das Modellsystem neben den zwei Grundkomponenten Kreatinin und Glycin aus einer Mischung von Glucose und einer weiteren Carbonylkomponente. Die Mengen an Modellkomponenten wurden so gewählt, dass sich ein molares Verhältnis von Kreatinin und Glycin zur Summe aus Glucose und der Carbonylkomponente von 1:1:0,5 ergibt. Dies entspricht zumindest bei den reduzierenden Zuckern dem Reaktionsoptimum (vgl. Kapitel 1.1.4.2). Die eingesetzten Carbonylkomponenten sind neben Xylose und Xyloseabbauprodukten bekannte Abbauprodukte von Hexosen wie Hydroxymethylfurfural oder Diacetyl, da so ein Vergleich zu entsprechenden Abbauprodukten von Pentosen gezogen werden kann. Der Anteil der eingesetzten Carbonylkomponenten an der Mischung mit Glucose bzw. Xylose variiert dabei von 0 bis 100 mol-%. Anhand verschiedener Mischungsverhältnisse kann ermittelt werden, inwieweit zugesetzte Xylose bzw. Abbauprodukte, die im Rahmen der Maillard-Reaktion von Pentosen entstehen, die Bildungsrate von HAAs in der Mischung beeinflussen. Anhand der ermittelten Gehalte an HAAs der Teilmodelle, die ausschließlich Glucose bzw. die entsprechende Carbonylkomponente enthalten, kann untersucht werden, ob synergistische Effekte bei verschiedenen Mischungsverhältnissen zu beobachten sind.

In einer dritten Kategorie werden nicht industriell hergestellte Reaktionsaromen des Maillard-Typs untersucht. In der Regel wird die Zusammensetzung der Modellmischungen so gewählt, dass sie einfache, überschaubare Systeme darstellen. So können multikausale Einflüsse verringert werden. Die Überschaubarkeit der Modellsysteme macht es möglich, grundlegende Tendenzen bei bestimmten Veränderungen einzelner Parameter zu erkennen. Modellsysteme sind normalerweise mit den meist komplex aufgebauten Lebensmitteln nicht zu vergleichen. Durch eine Ergänzung bekannter Modellsysteme mit Bestandteilen realer Reaktionsaromen kann geklärt werden, inwieweit ein Transfer von Erkenntnissen aus Modellsystemen auf reale Lebensmittel möglich ist. Die Untersuchung von selbst hergestellten, nach industriellem Vorbild zusammengesetzten Reaktionsaromen ist vorteilhaft, da die Rezepturkomponenten in ihrer Gesamtheit im Zusammenhang mit der bei der Herstellung notwendigen Erhitzung eine praxisnahe Matrix zur Bildung von HAAs bilden. Bei der industriellen Herstellung von Reaktionsaromen wird Fleischextrakt mit Zusätzen wie Cystein, Ascorbinsäure, Thiamin-

hydrochlorid und Xylose in geschlossenen wässrigen Systemen (65 g Wasseranteil pro 100 g Reaktionsansatz) erhitzt. Dabei ist besonders der Einsatz von Xylose von Interesse, da dieser stark aromafördernd ist.

In den eigenen Arbeiten wird nur ein Zusatz von Xylose und Xyloseabbauprodukten zu Fleischextrakt vorgenommen, um einen direkten Vergleich zu entsprechenden wasserarmen Avicel-Modellsystemen mit variablem Zusatz von Xylose und Xyloseabbauprodukten vornehmen zu können. Die zugegebene Menge an Carbonylkomponente ist an den ermittelten Kreatiningehalt (Summe von Kreatin und Kreatinin) des Fleischextraktes (vgl. Kapitel 3.9) so angepasst, dass sich wiederum ein molares Verhältnis von 0,5:1 ergibt.

Um Amadori-Verbindungen von Pentosen und ihre Abbauprodukte, die Desoxyosone, in den einzelnen Modellsystemen einsetzen zu können, müssen diese präparativ dargestellt werden. Diacetyl, Furfural, Hydroxymethylfurfural, Hydroxyaceton, Methylglyoxal sowie Norfuranol können in ausreichender Reinheit käuflich erworben werden. Eine Lagerung möglichst bei Temperaturen unter 4 °C ist anzustreben, da sonst nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Verbindungen mit sich selbst Kondensationsreaktionen eingehen. Dies ist dann oft durch verstärkte Braunfärbung zu erkennen. In allen drei Kategorien werden die Modellsysteme vor der Erhitzung auf einen  $a_w$ -Wert von 0,75 eingestellt.

### 3.2.3 Erhitzung von Avicel Modellsystemen

Um reproduzierbare und untereinander vergleichbare Ergebnisse zu bekommen, ist der Einsatz definierter Erhitzungsverfahren bei Avicel-Modellsystemen in den eigenen Untersuchungen unerlässlich. Da sowohl die Temperatur als auch die Erhitzungsdauer die Bildung von HAAs beeinflussen (vgl. Kapitel 1.1.4), ist es notwendig, diese Parameter für reproduzierbare Ergebnisse möglichst konstant zu halten. Daher werden in den Modellreihen zur HAA-Bildung (Kapitel 3.5 bis Kapitel 3.8) grundsätzlich nur zwei verschiedene Erhitzungsarten gewählt. Zu einen ist dies die im weiteren Verlauf genannte „Langzeit-Niedrigtemperatur-Erhitzung“ mit einer Erhitzungsdauer von 6 Stunden bei 120 °C, zum anderen die „Kurzzeit-Hochtemperatur-Erhitzung“ von einer Stunde bei 150 °C. Diese beiden Erhitzungsschritte – wengleich die Aromenverordnung [Lit. 14] nur Erhitzungszeiten „von höchstens 15 min auf nicht mehr als 180 °C“ zulässt – kommen den Temperatur-Zeit-Relationen der Verfahrensschritte zur Herstellung von Reaktionsfleischaromen relativ nahe. Durch Zusammenarbeit mit einem Produzenten von Reaktionsaromen des Maillardtyps hat Vollenbröcker Einblicke in die Herstellungsprozesse nehmen können. In seinen Arbeiten [Lit. 307] wird dies detailliert beschrieben. Die oben genannte rechtliche Einschränkung der Erhitzungszeit und der Tempera-

tur ist sehr eng gefasst und wird von den Herstellern von Reaktionsaromen kritisiert, da die Dauer der Erhitzung und die Höhe der Temperatur in Relation zueinander stehen. Diese Relation wird als F-Wert bezeichnet. Bei der Herstellung muss dieser F-Wert eingehalten werden, so dass bei geringeren Temperaturen eine längere Erhitzungsdauer erforderlich ist. Eine rechtliche Begrenzung des F-Wertes erscheint sinnvoller, ist aber nicht in der Aromenverordnung zu finden, welche die Umsetzung einer EG-Richtlinie darstellt. Bei Erhitzung der Ausgangsstoffe über einen längeren Zeitraum als 15 min handelt es sich dabei strenggenommen nicht mehr um Reaktionsaromen. Der Passus in der Aromenverordnung, der die Herstellung von Reaktionsaromen mit „nach redlichem Herstellerbrauch üblichen Verfahren durch Erhitzung ...“ beschreibt, relativiert die oben genannte Temperatur-Zeit-Begrenzung während der Erhitzung. Erhitzungstemperaturen deutlich unter 180 °C und Erhitzungszeiten deutlich über 15 min sind üblich.

In den eigenen Untersuchungen erfolgte die Erhitzung in dickwandigen, verschließbaren Glasgefäßen (nähere Angaben unter Kapitel 6.7.1), die während der Erhitzung geschlossen gehalten wurden. Geschlossene Systeme sind zu verwenden, da sonst verschiedene, in die Bildungsreaktion von HAAs eingehende Zwischenprodukte wie 2-Methylpyrazin (Siedepunkt: 134 °C bis 136 °C) oder 2-Methylpyridin (127 °C bis 129 °C) bei hohen Temperaturen teilweise entweichen und sich so dem Bildungsprozess der HAAs entziehen würden. Auch bei der industriellen Herstellung von Reaktionsaromen werden grundsätzlich verschlossene Reaktionsgefäße verwendet.

Die Erhitzung sollte im Umlufttrockenschrank erfolgen, da in diesem durch ausreichende Wärmekonvektion eine konstante Temperatur der in die Druckgefäße eingefüllten Reaktionsmischung sichergestellt ist.

Bei den Versuchen mit o-Phenylendiamin als Abfang-Reagenz (vgl. Kapitel 3.4.2) ist es sinnvoll, ähnliche Erhitzungsbedingungen zu wählen, um die tatsächlich in den Modellsystemen stattfindenden Prozesse anhand ihrer getrappten Zwischenprodukte zu erfassen. Da das o-Phenylendiamin bei dem Großteil der Versuchsreihen bereits in der entsprechenden Modellmischung enthalten ist, wird der Erhitzungsvorgang wegen der Flüchtigkeit des OPD, wenn nicht anders bemerkt, auf 70 °C für 30 min reduziert. Die Erniedrigung der Erhitzungstemperatur speziell bei dieser Art von Modell ist möglich, da bei 70 °C im Rahmen der Maillard-Reaktion schon die für die Bildung größerer Mengen an HAAs nötigen Glucose- bzw. Xylose-Abbauprodukte entstehen. Lediglich ihre Menge im Modellsystem steigt mit höherer Temperatur (vgl. Nyhammar [Lit. 215]). Zusätzlich besteht bei höheren Temperaturen die Gefahr, dass sich aus Komponenten der jeweiligen Modellmischung und dem



o-Phenylendiamin vermehrt die Auswertung störende Artefakte bilden, die polymerisieren können.

Modellmischungen, die zur Bräunungsmessung eingesetzt werden, werden nicht erhitzt, sondern lediglich bei Raumtemperatur in Exsikkatoren mit bestimmter Gleichgewichtsfeuchtigkeit gelagert. Dies ist möglich, da die zu betrachtenden pentosehaltigen Modellmischungen bereits nach einem Tag Lagerungsdauer eine ausgeprägte Bräunung zeigen. In diesem Fall soll weniger der Einfluss der Erhitzungstemperatur untersucht werden, sondern es sollen vielmehr die Reaktivitäten der in den Modellsystemen enthaltenen Xylose bzw. Glucose, die sich u. a. an der Intensität der sich entwickelnden Bräunung messen lassen, miteinander verglichen werden.

### **3.3 Bildung und präparative Darstellung von Carbonylkomponenten der Modellsysteme**

#### **3.3.1 Herstellung von Amadori-Produkten**

Die in der Literatur beschriebenen Strategien zur Darstellung von Amadori-Verbindungen basieren fast ausschließlich auf dem direkten Erhitzen eines Zuckers mit einer Aminokomponente [Lit. 326]. Dabei kann die Reaktion direkt in der Schmelze der Ausgangsverbindungen oder in Lösung unter Rückfluss stattfinden. Grundlage bilden die Arbeiten von Abrahms, Lowy und Borsook [Lit. 2], Anet und Reynolds [Lit. 9] sowie Publikationen von Heyns et al. [Lit. 93, 238]. Einerseits erhält man die Amadori-Verbindungen durch Erhitzen der entsprechenden Aminosäuren und reduzierenden Zucker in absolutem Methanol, andererseits durch Erhitzen eines Sirups aus Glucose, Aminosäure, Natriumpyrosulfit und Wasser. Durch diese Reaktionsbedingungen steuert man den Verlauf der beginnenden Maillard-Reaktion so, dass diese auf der Stufe der Amadori-Verbindungen stehen bleibt. Daneben wird von Xenakis und Moll [Lit. 319] eine Synthese von Amadori-Verbindungen unter Zuhilfenahme von Aceton-Schutzgruppen über ein aktiviertes Zucker-Trifluormethansulfonsäure-Addukt beschrieben. Zumeist werden Glucose und andere Hexosen als Zuckerkomponenten gewählt. Mit dem Vorkommen und der Darstellung von Amadori-Verbindungen aus Pentosen befassen sich nur wenige Arbeiten (Hashiba [Lit. 80]). Das europäische Patent EP 1252825/A1 vom 25. April 2001 [Lit. 49] sowie die auf Erkenntnissen der Erfindung beruhende Publikation von Beksan, Schieberle, Robert, Cerny und Hofmann [Lit. 21] beschreiben zunächst die Synthese und sensorische Charakterisierung von bisher noch nicht beschriebenen, nach der Geschmacksrichtung „umami“ schmeckenden Dikalium-N-Glykosiden der Glutaminsäure. Für entsprechende

Amadori-Verbindungen wie die N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-glutaminsäure werden diese Effekte ebenfalls aufgezeigt. Das Patent beansprucht auch die Synthese weiterer Amadori-Verbindungen, u. a. der Xylose-Amadori-Verbindung der Glutaminsäure. Die Synthese entspricht in weiten Teilen derjenigen von Xenakis und Moll.

Die in den eigenen Arbeiten durchgeführten Darstellungsversuche beruhen auf den Erkenntnissen der Dissertationen von Wittmann [Lit. 314] und von Liedke [Lit. 159] sowie auf Untersuchungen von Hashiba [Lit. 80].

Vorversuche dienten zur Erfassung der optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Temperatur und Zusammensetzung.

### 3.3.1.1 Vorversuche

In Anlehnung an die Dissertation von Liedke wurden Reaktionsansätze mit Xylose und L-Alanin unter Zusatz von Natriumdisulfit in absolutem Methanol angesetzt und erhitzt. Schon nach etwa 10-minütiger Erhitzung unter Rückfluss zeigte sich eine honiggelbe Eigenfarbe der Reaktionsmischung, die auch nach 120 min Erhitzung, zwar mit größerer Farbtiefe, erhalten bleibt. Wird Natriumdisulfit als Edukt weggelassen, ist die gelbe Eigenfärbung bereits nach 5-minütiger Erhitzung zu erkennen. Nach etwa 40 min ist ein solcher Reaktionsansatz tiefbraun, nach 120 min nahezu schwarz. Im Rahmen von Vorversuchen wurden von unterschiedlichen Modellansätzen (Variation entweder der Erhitzungstemperatur oder der Erhitzungsdauer) jeweils aliquote Teile der jeweiligen Reaktionsmischung entnommen; das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom abgeblasen (Heizblock 70 °C, 150 ml N<sub>2</sub>/min) und die Analysenproben wurden mittels GC-MS nach Oximierung und Silylierung analysiert (vgl. Multimethode Kapitel 3.4.3 und Arbeitsvorschriften Kapitel 6.8.5.2). Es konnten lediglich in den 20 min unter Rückfluss erhitzten Xylose-Alanin-Modellansätzen die Bildung von Amadori-Verbindungen der Xylose in geringer, mittels GC-MS nach Oximierung und Silylierung nachweisbaren Mengen festgestellt werden.

Eine standardmäßig benutzte Reaktionsapparatur besteht aus einem Dreihalskolben (500 ml) mit aufgesetztem Intensivkühler, einem Magnetrührer, einem Heizpilz (Steuerung der Heizleistung über einen in die Reaktionslösung eintauchenden Temperaturfühler eines elektronischen Reglers) und einer Regeleinheit für die Zudosierung von Spülgasen in die geschlossene Reaktionsapparatur (ein Gärröhrchen, gefüllt mit Paraffin dient als Druckausgleich, Spülgase können während der Rühr-, der Erhitzungs- und der Abkühlphase durch eine Edelstahlkapillare direkt in die Lösung eingeleitet werden).

Durch Vorversuche allein werden bei Variation bestimmter Reaktionsparameter lediglich Tendenzen erkennenbar. Um die Bildungsrate entstehender Amadori-Verbindungen näher beschreiben zu können, bedarf es einer „Online“-Bestimmung der einzelnen Reaktionsprodukte.

### 3.3.1.2 Bestimmung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Xylose-Alanin-Modellansätzen als OPD-Addukte

Um die Bildungsrate entstehender Amadori-Verbindungen (AV) näher beschreiben zu können, bedarf es einer „Online“-Bestimmung der einzelnen Reaktionsprodukte. Da ein großer Teil der AV rasch abgebaut wird, ist die Bildungsrate von primären Abbauprodukten wie  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen (Desoxyosone der Xylose, 2-Xylosen) eine wichtige zu bestimmende Größe. Da  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen schnell weiterreagieren und somit schwer zu fassen und zu bestimmen sind, wurde die in Kapitel 3.4.2 näher beschriebene Abfangreaktion mit ortho-Phenylendiamin (OPD) genutzt. In der Abfangreaktion mit OPD können grundsätzlich alle Verbindungen mit einer  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur wie Desoxyosone und Xylosone quantitativ zu den entsprechenden Chinoxalinen umgesetzt werden.

Zur Voruntersuchung dienende Reaktionsansätze enthielten – wenn nicht anders vermerkt – jeweils 13 mmol Xylose, 6 mmol Alanin und 5 mmol OPD in 50 ml absolutem Methanol als Reaktionsmedium. Während der entsprechenden Erhitzung wurde in gewissen Zeitabständen jeweils ein aliquoter Teil entnommen, sofort abgekühlt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 70 °C abgeblasen. Der Rückstand wurde zur gaschromatographischen Untersuchung (nach Wittmann) direkt oximiert (Hydroxylammoniumchlorid in Pyridin, 70 °C, 30 min) und silyliert (MSTFA+TMCS, 70 °C, 30 min). Die Gaschromatographie wurde jeweils mit Flammenionisationsdetektor (GC-FID) bzw. mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte über Xylit als innerem Standard. Da es sich um unbekannte Verbindungen handelt, wurden die Responsefaktoren hilfsweise gleich 1 gesetzt.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden zahlreiche Reaktionsansätze mit der beschriebenen Grundmischung aus Xylose, Alanin und OPD hergestellt. Dabei wurde u. a. der Einfluss unterschiedlicher Reaktionstemperaturen (Ansatz 1 und 2) und der Zusatz von unterschiedlichen Reduktionsmitteln (in Ansatz 3 Natriumdisulfit) untersucht. In Ansatz 4 erfolgt durch Zusatz von Glucose neben der Amadoriverbindung der Xylose die Bildung der Amadoriverbindung der Glucose. So sind die Bildungsraten dieser beiden Amadori-Verbindungen – einen stetigen

Überschuss der Aminosäure Alanin vorausgesetzt – miteinander vergleichbar. Da sich Aminosäuren auch unter mäßiger Wärmeeinwirkung schlecht in Methanol lösen, wurde 70 %-iges Methanol (v/v) als Reaktionsmedium verwendet, um für die Reaktion immer ausreichende Mengen an Aminosäure zur Verfügung stellen zu können.

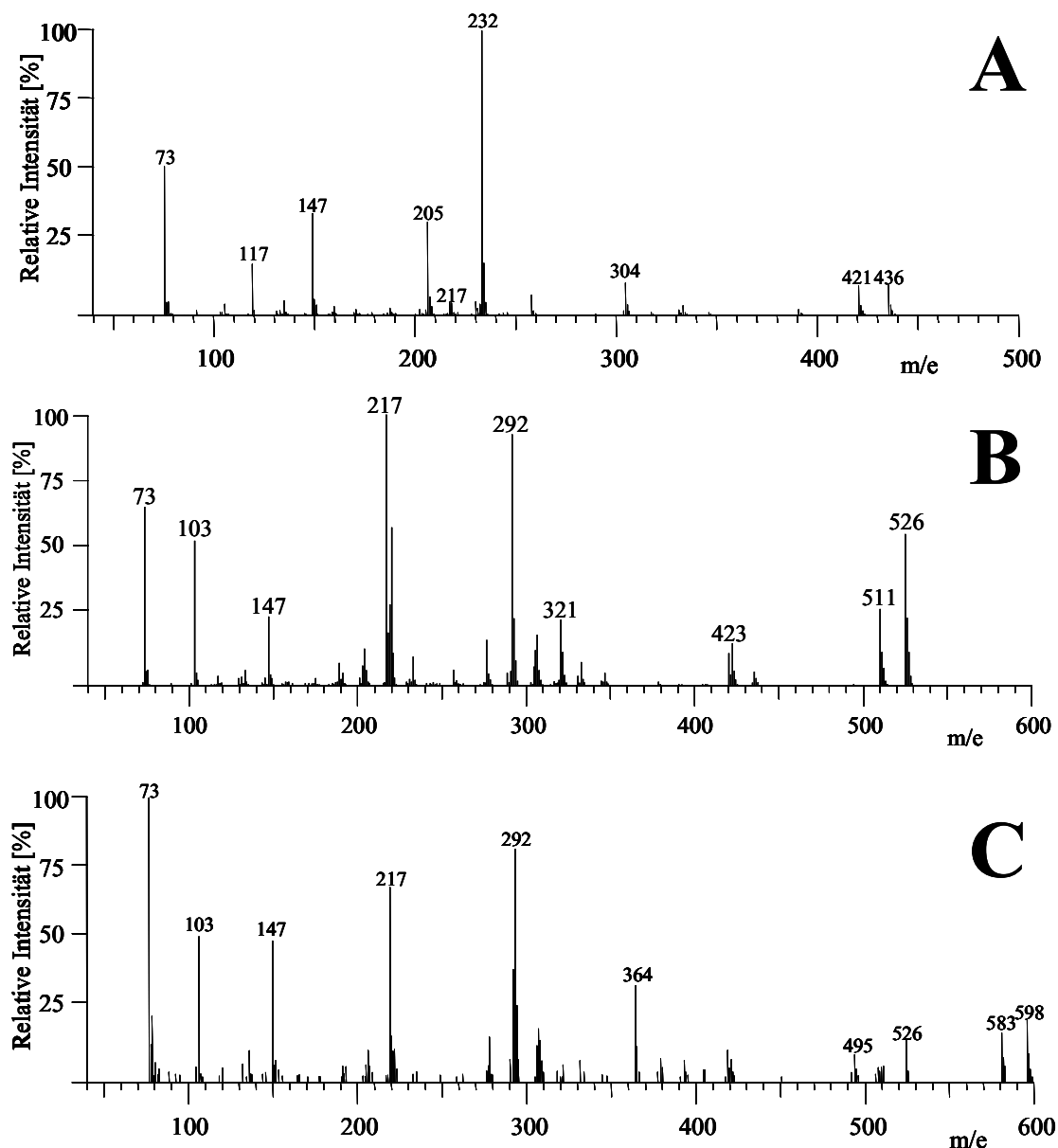
#### **Ansatz 1:**

Ein Reaktionsansatz bestehend aus 14,5 mmol Xylose, 7,25 mmol L-Alanin und 5 mmol ortho-Phenylendiamin (OPD) in 50 ml absolutem Methanol wurde konstant bei 38,5 °C gehalten. Der Reaktionsansatz bleibt lange farblos und zeigt nach 55 min eine gelbliche Färbung. Wie in verschiedenen Chromatogrammen der GC-FID (exemplarisches Chromatogramm nach 59 min im Anhang unter Kapitel 8.2) nach unterschiedlichen Probenahmezeiten zu erkennen, werden zwar neben Xylose weitere Verbindungen im Chromatogramm erkennbar, jedoch macht das kleine Signal-Rausch-Verhältnis eine Auswertung unmöglich. Mittels GC-MS lassen sich neben Xylose ab 40 min Erhitzungsdauer nach Oximierung und Silylierung Verbindungen mit dem Masse-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) der Molekülpeaks von 436 (Abb. 3.2, A), 526 (B), 598 (C) detektieren. Wie in den Untersuchungen zur Strukturaufklärung in Kapitel 3.5.2 näher beschrieben, handelt es sich bei A um das durch Reaktion von Xyloson mit OPD gebildeten Chinoxalin ( $m/z = 436$ ) sowie bei B und C um ein OPD-Addukt der Xylose (Formelschema in Abb. 3.2). Da ortho-Phenylendiamin zwei freie Aminogruppen enthält, kann die mesomer stabilisierte 2-Xylosulose sich addieren und so eine SCHIFF'sche Base bilden. Bei der Verbindung B ist die noch freie Aminogruppe des OPD am Stickstoff nicht silyliert, bei der Verbindung C einfach silyliert. Die Reaktion zu B und C ist unerwünscht, da nicht geklärt ist, inwieweit diese das Produkt dieser Nebenreaktion mit in die Beobachtung eingezogen werden kann. Das Vorhandensein von A zeigt sicher, dass zwar die entsprechende Xylose-Amadori-Verbindung gebildet wurde, aber direkt zum Xyloson aufoxidiert wurde.

#### **Ansatz 2:**

Ein unter Rückfluss (etwa 67 °C) gehaltener Reaktionsansatz (14,5 mmol Xylose, 7,25 mmol L-Alanin und 5 mmol OPD in 50 ml absolutem Methanol) zeigt bereits nach 5 min eine gelbliche Färbung. Das aus dem Xyloson gebildete Chinoxalin (A) und die unterschiedlich silylierten SCHIFF'schen Basen (Verbindung B und C) lassen sich nach 12-minütiger Erhitzung in geringer Konzentration nachweisen. Eine weitergehende Untersuchung ist nicht möglich, da

die ab 20 min Erhitzungsdauer entnommenen Proben nach rascher Abkühlung gelartig erstarren, was die Entfernung des Lösungsmittels unmöglich macht.



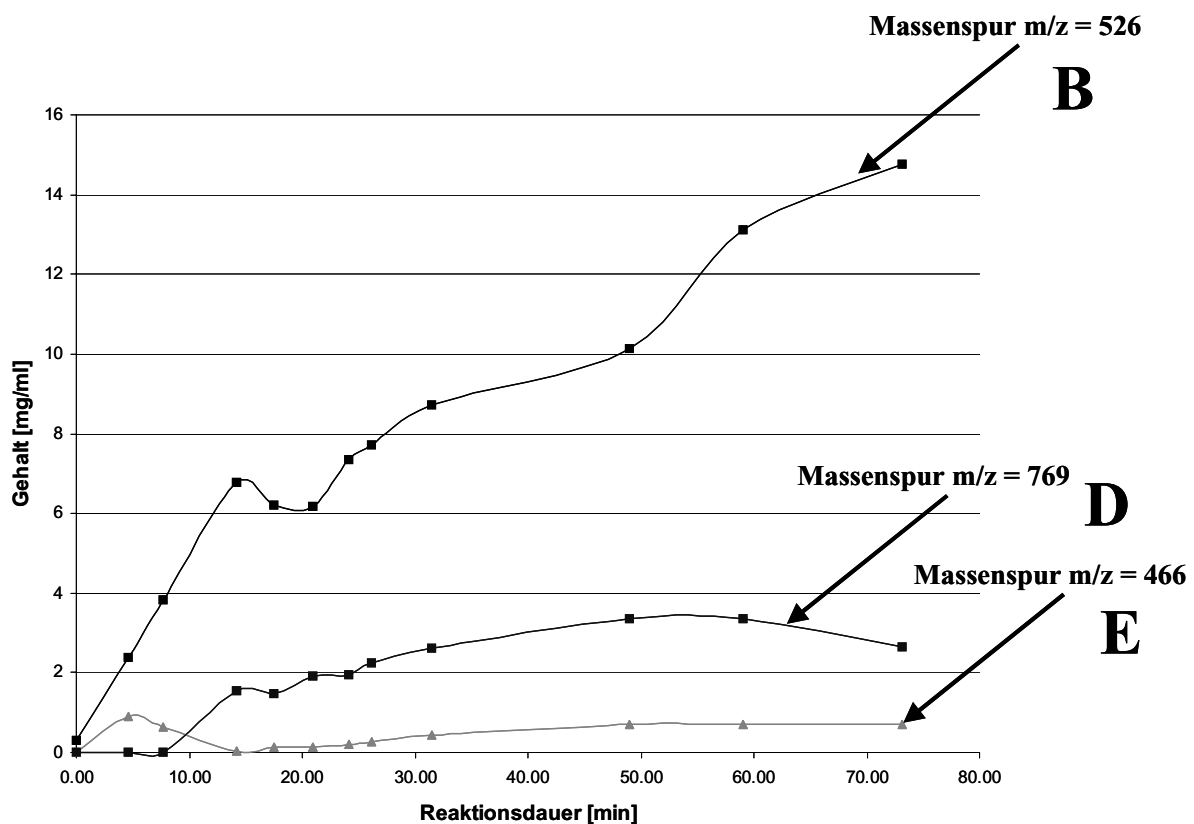
**Abbildung 3.2**

In Reaktionsansätzen von Xylose, L-Alanin und OPD in absolutem Methanol mittels GC-MS-EI (vgl. Kapitel 6.8.5.3) nachweisbare Verbindungen Verbindungen A ( $m/z = 436$ ), B (526) und C (598); charakteristisches Fragmentierungsmuster des silylierten Chinoxalins der 2-Xylosulose und OPD (A) sowie die unterschiedlich silylierten SCHIFF'schen Base von 2-Xylosulose und OPD (B bzw. C); Strukturaufklärung aus Kapitel 3.5.2 entnommen

### Ansatz 3:

Der Xylose (14,5 mmol), Alanin (7,25 mmol) und OPD (5 mmol) enthaltenden Grundreaktionsmischung wird zusätzlich 5 mmol Natriumdisulfit hinzugefügt. Die Reaktionstemperatur beträgt 67 °C. Mit GC-FID konnten neben Xylose und der SCHIFF'schen Base aus 2-Xylosulose und OPD (B,  $m/z = 526$ ) noch zwei weitere Verbindungen getrennt und quantitativ bestimmt werden (vgl. Anhang unter Kapitel 8.2). Die Masse-Ladungsverhältnisse der

Molekülpeaks dieser unbekannt Verbindungen wurden durch GC-MS mit  $m/z = 466$  (Verbindung D) und  $m/z = 769$  (Verbindung E) bestimmt (zugehörige Massenspektren im Anhang unter Kapitel 8.3.2 und 8.3.3). Die Molekülpeaks sind bei diesen Verbindungen zwar relativ stark ausgeprägt, sodass eine Bestimmung der exakten Massen über Gaschromatographie mit Flugzeitmassenspektrometer (GC-TOF) möglich ist. Jedoch lässt sich keine sinnvolle Summenformel für  $m/z = 466$  und  $m/z = 769$  finden. Das entsprechende Fragmentierungsmuster erlaubt keinen Rückschluss auf die Grundstruktur der unbekannt Verbindung. Eine rechnergestützte Bibliotheksrecherche, die klare Grundstrukturen mit charakteristischer Fragmentierung voraussetzt, ist somit nicht möglich.



**Abbildung 3.3**

Quantitative Auswertung der GC-FID-Bestimmungen der Analysenproben von Ansatz 3 (Ordinate: Gehalt der entsprechenden Substanz in der methanolischen Reaktionslösung)

Abbildung 3.3 zeigt die Bildungsrate der in den Analysenproben als OPD-Addukt detektierbaren Verbindung B sowie der Verbindungen unbekannter Struktur D und E. Die Berechnung erfolgte über Xylit als innerem Standard. Die Responsefaktoren wurden hilfsweise gleich 1 gesetzt. In erster Näherung steigt die Konzentration der SCHIFF'schen Base aus 2-Xylosulose und OPD ( $m/z = 526$ ) linear mit der Reaktionszeit. Nach 60 min beträgt der molare Anteil des Adduktes etwa ein Drittel der molaren Ausgangsmenge der Xylose im methanolischen Reaktionsansatz. Erst nach 8 min Reaktionszeit wird die Verbindung E in größeren Mengen gebil-

det. Ohne die Kenntnis, um welche Verbindungen es sich hierbei genau handelt, ist eine klare Interpretation nicht möglich. Eine Auffälligkeit bei der Auswertung der GC-MS-Chromatogramme von jeweils nach unterschiedlicher Reaktionsdauer entnommenen, oximierten und silylierten Proben äußerte sich darin, dass auch noch Peaks mit  $m/z = 436$  mit geringer Intensität bzw. mit  $m/z = 598$  mit mäßiger Intensität im Vergleich zu  $m/z = 526$  auftreten. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind diese nicht mit in Abbildung 3.3 aufgenommen worden. Es ist zu vermuten, dass die Bildung des im Reaktionsansatz als entsprechendes Chinoxalin nachgewiesenen Xylosens durch das Reduktionsmittel Natriumdisulfit unterdrückt wird. Vielleicht reagiert eine möglicherweise intermediär entstandene Amadori-Verbindung zu D und E.

#### **Ansatz 4:**

Die im Ansatz 4 verwendete Reaktionsmischung weicht von der Zusammensetzung dahingehend ab, dass neben 14,5 mmol Xylose, 7,25 mmol L-Alanin und 5 mmol Natriumdisulfit OPD nicht als Abfangreagenz zugesetzt wird, um die Adduktbildung des OPDs mit der Xylose zu vermeiden. Zusätzlich wird der Reaktionsmischung noch 3,5 mmol Glucose hinzugefügt. Als Reaktionsmedium wird 50 ml 70%iges Methanol eingesetzt. Jede Analysenprobenahme wird doppelt durchgeführt. Eine Analysenteilprobe wird, wie in der Vorbemerkung beschrieben, direkt aufgearbeitet, oximiert und silyliert. Bei der anderen Teilprobe wird eine Nachderivatisierungsreaktion durchgeführt, indem in Bezug auf das Volumen der Teilprobe eine jeweils gleiche Menge einer 1 M wässrigen OPD-Lösung hinzugefügt und 2 Stunden bei 30 °C inkubiert wurde, um entstandene  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zu entsprechenden Chinoxalinderivaten umzusetzen, ehe diese Teilprobe weiter aufgearbeitet, oximiert und silyliert wird.

Bei der Auswertung der GC-MS-Chromatogramme der Analysenproben ohne Nachderivatisierung mit OPD lässt sich eine Zunahme der Bildung von 1-Desoxy-1-Alanyl-xylulose (Xyl-Ala bestimmt als oximiertes und silyliertes Derivat mit  $m/z = 596$  bzw.  $m/z = 668$ ) und 1-Desoxy-1-alanyl-fructose (Fru-Ala;  $m/z = 683$ ) in Proben bis zu einer Erhitzungsdauer von 45 min feststellen. Dabei ist die gebildete Menge (berechnet mit Responsefaktor 1) an 1-Desoxy-1-alanyl-xylulose 10-fach höher ist als die Menge an Fru-Ala. Entsprechende Fragmentierungen finden sich im Anhang für das silylierte Xyl-Ala (stärkstes Fragment ist  $m/z = 596$ ) unter Kapitel 8.4.1, für das zusätzlich an der Aminogruppe silylierte Xyl-Ala (stärkstes Fragment ist  $m/z = 668$ ) unter Kapitel 8.4.3 und für das silylierte Fru-Ala (stärkstes

Fragment ist  $m/z = 683$ ) unter Kapitel 8.5. Eine genaue Zuordnung der Massenzahlen und Interpretation der Fragmentierungen findet sich zusätzlich im Kapitel 3.3.1.6.

Mit zunehmender Erhitzungsdauer findet ein Abbau der Amadori-Verbindungen statt (nach 108 min sind noch 50 %, nach 133 min nur noch 5 % der nach 45 min enthaltenen Konzentrationen nachweisbar). Die entsprechenden Fragmentierungen sowie ein Beispielchromatogramm finden sich im Anhang unter Kapitel 8.5.1. In den Analysenproben, die zusätzlich einer Nachderivatisierung unterworfen werden, sind im GC-MS-Chromatogramm kaum Amadori-Verbindungen mehr nachzuweisen. Betrachtet man zum Vergleich die jeweils parallel aufgearbeiteten Analysenproben ohne Nachderivatisierung, so stellt man fest, dass offensichtlich ein Abbau des Xyl-Ala und des Fru-Ala stattgefunden haben muss. Zum einen kann dies daran liegen, dass die underivatisierten Amadori-Verbindungen in methanolisch-wässriger Lösung nicht über zwei Stunden (Zeitraum für die Derivatisierung) stabil sind; zum anderen könnte die Anwesenheit von OPD ihren Abbau beschleunigen. Auffällig ist, dass sich gleichzeitig die silylierte SCHIFF'schen Base aus 2-Xylosulose und OPD B mit  $m/z = 526$  detektieren lässt. Die Bildungsrate verläuft zeitlich etwa gleich wie die von 1-Desoxy-1-Alanyl-xylulose (Xyl-Ala), welche aus der nicht-derivatisierten Teilprobe ermittelt werden kann. Ein Abbau der Verbindung B mit  $m/z = 526$  bei längerer Erhitzungszeit ist ähnlich wie in Ansatz 3 nicht zu erkennen.

Ferner lässt sich eine Verbindung mit  $m/z = 628$  detektieren. Die Fragmentierung lässt auf eine SCHIFF'sche Base aus dem Glucoson und OPD schließen.

Obwohl während der gesamten Reaktionsdauer im Reaktionsgefäß eine Stickstoffatmosphäre vorliegt, entsteht das als Chinoxalinderivat nachgewiesene Xyloson. Das möglicherweise nur intermediär gebildete Xylulose-Alanin könnte eine Autoxidation zum Xyloson erfahren haben. Um geeignete Reaktionsparameter für die präparative Darstellung zu finden, wurde in den Vorversuchen davon ausgegangen, dass das in den Reaktionsansätzen gebildete und als entsprechendes silyliertes Chinoxalinderivat bestimmbare Xyloson als Marker für die intermediär gebildete 1-Desoxy-1-Alanyl-xylulose anzusehen ist.

Zusammenfassend kann daher aus den beschriebenen OPD-Trapping-Versuchen gefolgert werden, dass der Zusatz eines Reduktionsmittels wie Natriumdisulfit unerlässlich ist, damit die Maillard-Reaktion nicht über die Bildung von Primärprodukten hinaus abläuft. Die Reaktion sollte unter Rückfluss stattfinden und nach 40 - 45 min beendet werden, damit nicht ein all zu starker Abbau der Xylose-Amadori-Verbindungen in methanolischer Lösung erfolgt. Eine Trennung der Reaktionsführung in Rühr-, Erhitzungs- und Abkühlphase mit klar definierten Temperaturbedingungen und Standzeiten der Reaktionsmischung ist notwendig, um



aus gleich zusammengesetzten Reaktionsmischungen reproduzierbare Ausbeuten an Reaktionsprodukten zu erhalten.

### 3.3.1.3 Präparative Herstellung von Amadori-Verbindungen der Xylose

Es wurde versucht, die Erkenntnisse aus den Vorversuchen mit dem Ziel umzusetzen, Xylose-Amadori-Verbindungen präparativ darzustellen, um sie in entsprechenden Modellsystemen einzusetzen.

Zur Synthese der gewünschten Amadori-Verbindungen werden 70 mmol Xylose, 35 mmol Aminosäure (Glycin oder Alanin) und 2,5 g Natriumdisulfit in einen Dreihalskolben eingewogen. Der Mischung wird 250 ml Methanol (frisch über KOH destilliert) hinzugefügt (vgl. Kapitel 6.3.1). In die gesamte Reaktionsapparatur wird während der dreistufigen Reaktionsführung (bestehend aus der Rühr-, der Erhitzungs- und der Abkühlphase, vgl. Kapitel 6.3.1) ständig Stickstoff eingeleitet. Die Reaktionslösung wird in 10 min auf 67 °C erhitzt und 30 min bei dieser Temperatur gehalten. Die abgekühlte Reaktionsmischung wird abfiltriert, das Filtrat in einen Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer zu einem sirupösen Rückstand eingeeengt (vgl. Kapitel 6.3.2). Das so erhaltene Rohpräparat muss durch geeignete Aufreinigungsschritte soweit aufgearbeitet werden, dass die jeweilige reine Xylose-Amadori-Verbindung von noch enthaltener Xylose, nicht umgesetzten Aminosäuren sowie zahlreichen Reaktionsfolgeprodukten vollkommen abgetrennt wird. Vor der Durchführung geeigneter Aufreinigungsschritte ist es sinnvoll, das Rohpräparat hinsichtlich Reinheit und zu erwartender Ausbeute zu untersuchen. So können Entscheidungen getroffen werden, ob eine Aufreinigung überhaupt möglich ist und ob diese hinsichtlich der Ausbeute lohnenswert erscheint.

Standardmäßig (vgl. Wittmann [Lit. 314] und Liedke [Lit. 159]) wird das Rohpräparat in wenig Eisessig und verdünnter Essigsäure gelöst und die Lösung zur weiteren Aufreinigung auf eine frisch regenerierte Kationenaustauschersäule (meist Merck Lewatit<sup>®</sup> S1080) gegeben. Das Prinzip der Reinigung und Isolierung an der Kationenaustauschersäule beruht darauf, dass nur Aminosäuren und die zu gewinnende Amadori-Verbindung an das Säulenmaterial gebunden werden. Im Weiteren wird mit genügend Wasser so lange eluiert, bis keine Zucker im Eluat mehr nachzuweisen sind. Anschließend werden die Aminosäuren und Amadori-Verbindungen mit einer ausreichenden Menge verdünnter Trichloressigsäure (0,2 mol/l H<sub>2</sub>O) oder wässriger Ammoniaklösung (1 mol/l) von der Säule eluiert. Aufgrund der zeitlich versetzten Elution unterschiedlicher Analyten können Einzelfractionen, die jeweils nur die Aminosäure bzw. nur die entsprechende Amadori-Verbindung enthalten, mit einem Fraktionssammler aufgefangen werden. Aufgrund von Tüpfelreaktionen (Ninhydrinreaktion in essig-

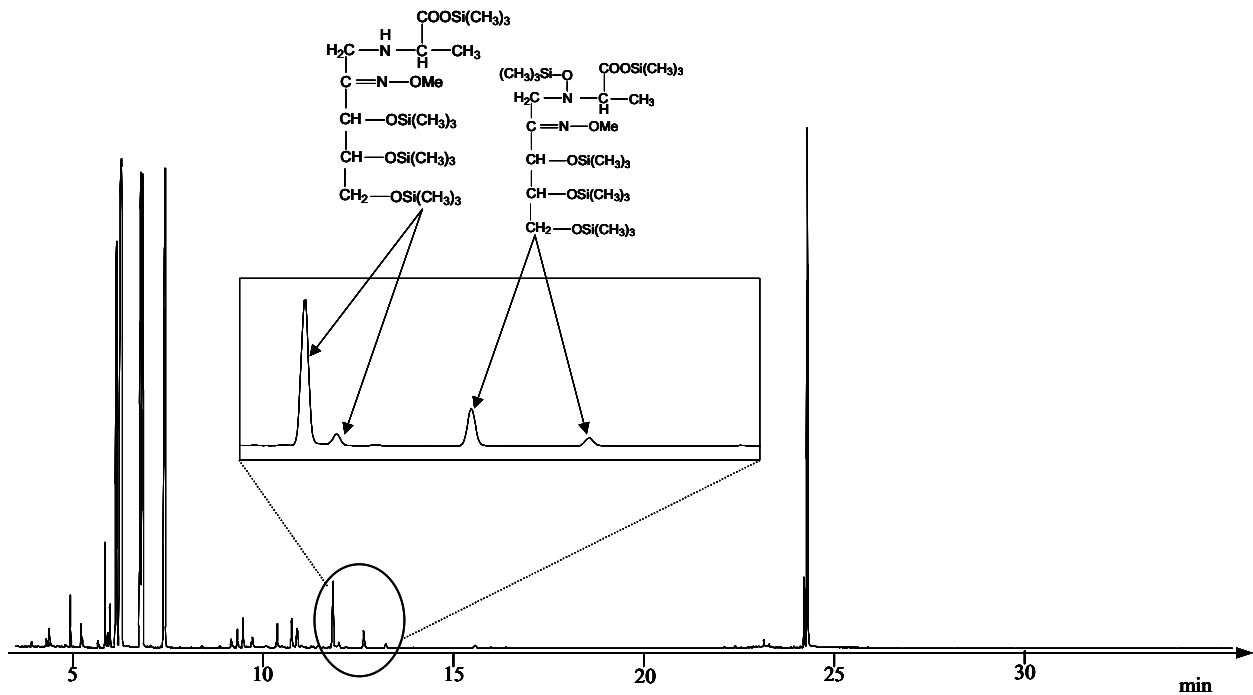
saurem n-Butanol; Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid in alkalischer wässriger Lösung) werden Amadori-Verbindungen enthaltende Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer eingengt, anschließend bei -18 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet.

Nachfolgend werden die in den eigenen Arbeiten für die Gewinnung eines Präparats von hoher Reinheit und akzeptabler Ausbeute als sinnvoll erachteten weiteren Arbeitsschritte aufgeführt. Neben der standardmäßigen Aufreinigung an einem stark sauren Kationenaustauscher werden weitere, in den eigenen Arbeiten durchgeführte alternative Aufreinigungsverfahren beschrieben.

#### **3.3.1.4 Untersuchungen vor der Reinigung und Isolierung des Rohpräparates**

Zunächst wurde Xylose mit Glycin umgesetzt. Bevor ein auf oben beschriebene Weise gewonnenes Rohpräparat weiter gereinigt und das gebildete Xylulose-Glycin isoliert wird, ist es sinnvoll, dieses näher zu untersuchen, um die spätere Reinigung und Isolierung ggf. anzupassen. Aus einem Reaktionsansatz aus Glycin, Xylose und Natriumdisulfit lässt sich nach einer Reaktionszeit (incl. Aufheizphase) von 40 min eine deutliche Braunfärbung erkennen. Nach erfolgter Oximierung und Silylierung kann jedoch mit GC-MS kaum Xylulose-Glycin nachgewiesen werden. Das Rohpräparat enthält viele Verbindungen, deren Fragmentierung auf einen Zuckergrundkörper hindeuten. Es könnte sich um Fragmente aus nicht näher definierbaren gefärbten Kondensationsprodukten handeln. Eine Aufreinigung am Kationenaustauscher bzw. HPLC-Säule birgt daher die Gefahr, dass die jeweiligen Säulenmaterialien irreversibel durch gebildete Kondensationsprodukte geschädigt werden. Anhand der beschriebenen Vorversuche ist von einer geringen Ausbeute auszugehen, da in den Reaktionsansätzen die vielfach nur intermediär gebildeten Xylulose-Amadori-Verbindungen offenbar zu nicht näher bestimmbareren Folgeprodukten weiterreagieren.

Im Folgenden wird daher ein Reaktionsansatz aus Alanin, einer Aminosäure mit im Vergleich zu Glycin geringerer Reaktivität, Xylose und Natriumdisulfit angesetzt. Wie aus Abbildung 3.4 ersichtlich, führt dies nach einer Reaktionszeit von 40 min zu geringen Ausbeuten an Xylulose-Alanin. Die Xylose hat sich nur zu 0,75 % zu Xylulose-Alanin umgesetzt. Die auf diese Weise hergestellten Rohpräparate werden für die folgenden von uns erprobten Aufreinigungsschritte eingesetzt.



**Abbildung 3.4**

GC-MS-Chromatogramm des durch Reaktion von Xylose mit Alanin gewonnene Rohpräparats nach Oximierung/Silylierung. Die Vergrößerung zeigt jeweils Peaks der silylierten syn- und anti-Oxime von Xyl-Ala (z.T. an der Aminofunktion silyliert)

### 3.3.1.5 Reinigung des Rohextraktes und Versuch der Isolierung von Xylulose-Amadori-Verbindungen

In den eigenen Arbeiten wurden mehrere alternative Reinigungs- und Isolierungsmethoden erprobt:

#### I. Aufreinigung am Kationenaustauscher

Die nach Kapitel 6.3.2 erhaltenen Xylulose-Alanin enthaltenden Rohpräparate werden an einem stark sauren Kationenaustauscher (Merck Lewatit<sup>®</sup> S1080) mit 0,2 m Trichloressigsäure als Eluent wie unter Kapitel 6.3.3.2 beschrieben gereinigt. Eine derartige Reinigung führt jedoch zu keinem zufrieden stellenden Ergebnis, da auch bei wiederholter Durchführung in keiner der aufgefangenen Fraktionen weder mit den selektiven Tüpfelreaktionen (vgl. Kapitel 6.3.3.1) Amadori-Verbindungen noch mit GC-MS speziell Xylulose-Alanin nachgewiesen werden können. Auch C<sub>3</sub>- und/oder C<sub>4</sub>-Komponenten (Glyoxal, Methylglyoxal), die Spaltungsprodukte von Zuckern darstellen, können nicht nachgewiesen werden. Bei einer erneuten Regeneration der Austauschersäule mit 3 M Salzsäure fällt auf, dass der Säulenausfluss stark goldgelb gefärbt ist. Hierbei könnte es sich um Kondensationsprodukte der Amadori-Verbindung handeln, die an der Säule haften geblieben sind. Ein Nachweis hierfür konnte nicht geführt werden.

Im Rohpräparat können sich niedermolekulare, aus kondensierten Fünf- und Sechsringen bestehende Bräunungsprodukte gebildet haben (vgl. Arbeiten von Hofmann et al. [Lit. 100]). Diese sind jedoch in gewissem Maße wasserlöslich und werden größtenteils im Waschschrift mit Wasser mit den freien Zuckern von der Säule gespült. Die Waschflüssigkeit ist zunächst braun, wird dann aber rasch wieder farblos. Es ist zu vermuten, dass sich in trichloressigsäurem Milieu während der Elution praktisch das gesamte Xyl-Ala des Rohpräparates bzw. die infolge des sauren Milieus vermehrt gebildeten Folgeprodukte wie Furfural und Norfuraneol des Rohpräparates Folgereaktionen (insbesondere Kondensationsreaktionen) eingehen. Derartige Kondensationsprodukte, zumeist mehrfach geladen, können so stark an den Austauschere binden, dass sie nur durch erhöhte  $H^+$ -Ionenkonzentration wieder abgelöst werden können. Denkbar ist auch, dass im Verlauf der Reaktion gebildete höhermolekulare Kondensationsprodukte wegen ihrer Größe stärker am Kationenaustauscher adsorbiert werden und nur verzögert von der Säule gespült werden können. Eine erhöhte Säurekonzentration (3 M Salzsäure) könnte bei der Regeneration zu einer Spaltung der Kondensationsprodukte führen. Die Spaltprodukte eluieren dann möglicherweise als goldgelber Ausfluss von der Säule. Ein direkter Nachweis von Kondensationsprodukten ist häufig schwierig, da dafür spezielle HPLC-MS- bzw. NMR-Techniken angewandt werden müssen.

Da der Abbau des Xylulose-Alanins in trichloressigsäurem Milieu nicht ausgeschlossen werden kann, muss ein anderes Elutionsmittel gewählt werden. An stark saure Kationenaustauscher gebundene Substanzen können auch durch 1 M wässrige Ammoniaklösung eluiert werden. Durch den Austausch von  $H^+$  gegen  $NH_4^+$  ist eine rasche Absenkung des pH-Wertes zu beobachten, da von den nicht durch Analyt belegten Bindungsstellen des Kationenaustauschers vermehrt  $H^+$ -Ionen freigesetzt werden. Das im Rohpräparat enthaltene Xyl-Ala kann jedoch weder mit 1 M noch mit 2 M Ammoniaklösung von der Austauschersäule eluiert werden. Erst in Fraktionen, die mit konzentrierter Ammoniaklösung (25 %-ig) eluiert werden, kann mit GC-MS Xyl-Ala in geringen Mengen (größenordnungsmäßig ca. 0,3 % bezogen auf die eingesetzte Xylose) nachgewiesen werden.

Werden die Xyl-Ala enthaltenden Fraktionen vereinigt, der enthaltene Ammoniak am Vakuumrotationsverdampfer bei mäßiger Wasserbadtemperatur entfernt und die gesamte Lösung tiefgefroren, um sie anschließend gefrierzutrocknen, so ist es möglich, das Xyl-Ala enthaltene Lyophilisat durch GC-MS und NMR näher zu charakterisieren.

Dieses Lyophilisat hat eine gelbe Eigenfarbe und ist komplett wasserlöslich. In Pyridin ist das gewonnene Lyophilisat nahezu vollständig löslich, in Methanol und DMSO löst es sich mit wenig weißem Bodensatz. Dieser Bodensatz konnte nach Filtration und Entfernung des Lö-

sungsmittels im Vakuum mittels IR-Spektroskopie als die in der Reaktionsmischung eingesetzte Aminosäure Alanin identifiziert werden.

Zur Absicherung der Struktur wurde an einer in Pyridin gelösten, oximierten und silylierten Probe des Lyophilisats mittels GC-MS-EI bestätigt, dass es sich hierbei fast ausschließlich um Xyl-Ala handelt, das in dieser Form als Edult in Avicel-Modellen eingesetzt werden kann.

Eine weitere Reinheitsüberprüfung erfolgt über die Kernresonanzspektroskopie (NMR). Weder eine in deuteriertem Methanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) noch eine in deuteriertem DMSO ( $\text{DMSO-d}_6$ ) gelöste Substanzprobe lässt sich mittels  $^1\text{H-NMR}$  näher untersuchen. Für einzelne Protonen lassen sich keine klaren chemischen Verschiebungen bestimmen, die mit den berechneten Verschiebungen für Xyl-Ala in einer Computersimulation übereinstimmen (Verschiebungen siehe Anhang, Kapitel 8.8). Eine geringe Verunreinigung durch im stark alkalischen Milieu entstandene und gleichzeitig mit dem Xyl-Ala vom Kationenaustauscher eluierende Kondensationsprodukte ist nicht auszuschließen und könnte hierfür verantwortlich sein.

## II. Aufreinigung an Fractogel<sup>®</sup>-Kationenaustauschern

Das Grundgerüst von Fractogel-Ionenaustauscherharzen besteht aus quervernetzten Polymethacrylaten mit einer Porengröße von 800 Å. Diese Austauscherharze werden vornehmlich bei der präparativen Trennung von basischen Peptiden und Proteinen empfohlen. Da während der Elution an einem mit einer wässrigen Lösung des Rohpräparates beaufschlagten Fractogel-Ionenaustauscherharz mit einem Wasser/NaCl-Lösungs-Gradienten keine Verbindungen mit dem nachgeschalteten RI-Detektor (spezielle Anordnung siehe Kapitel 6.3.3.3) detektiert werden können, ist davon auszugehen, dass keine Komponente des im Abschnitt I erhaltenen Xyl-Ala-Rohpräparates an den Fractogel<sup>®</sup>-Kationenaustauscher bindet, obwohl laut Herstellerangaben eine hohe Affinität von Analyten mit sekundären Aminogruppen besteht. Auch eine Veränderung des Gradienten bezüglich Steilheit und NaCl-Endkonzentration ergab keine Änderung des Bindungsverhaltens. Ebenso führte eine modifizierte Regeneration (Citronensäurepuffer pH = 4,7 anstatt 1 mol/l Natronlauge) zu keinen weiteren Ergebnissen.

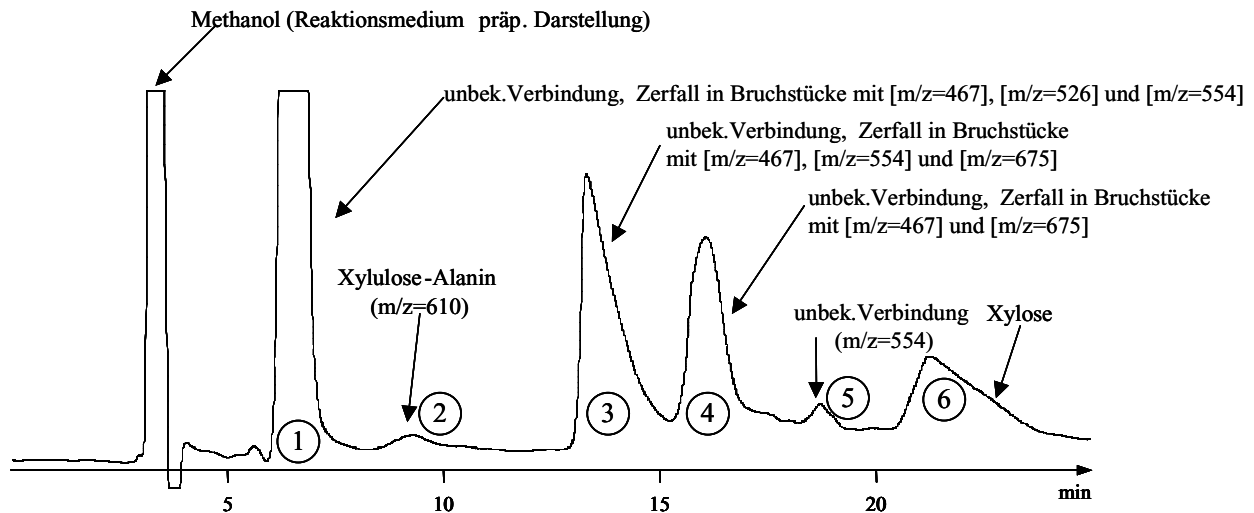
## III. Fraktionierung des Rohpräparates an einer Aminophase (HPLC)

Um größere Mengen an Substanz zu trennen, gibt es neben der klassischen Säulenchromatographie die Möglichkeit, die in letzter Zeit stark vorangetriebene präparative HPLC zu nutzen. Für die Trennung von Zuckern, Zuckerabbauprodukten und Reaktionsprodukten von Zuckern sowie strukturell ähnlichen Verbindungen können zahlreiche verschiedene Säulen-

typen und Eluenten bzw. Eluentengemische eingesetzt werden. (vgl. Übersichtsartikel von Herbreteau [Lit. 89], Hicks [Lit. 95] und Monographie von Scherz und Bonn [Lit. 242]).

Eine von Moll und Gross [Lit. 189] beschriebene semipräparative HPLC-Trennung von Amadori-Verbindungen aus einem wässrigen Reaktionsansatz von Valin und Glucose bzw. von Prolin und Maltose an einer chemisch gebundenen Umkehrphase konnte nicht für die Trennung des Rohextraktes genutzt werden. In verschiedenen Probenläufen von parallel hergestellten Reaktionsansätzen an einer RP-18e-Phase (analytische und semipräparative Säule) mit Wasser als Eluent konnte keine Trennung der aufgegebenen Probe erreicht werden. Vom Säulenmaterial wurden die aufgegebenen Analyten nur unzureichend zurückgehalten. Auch eine Modifikation des Eluenten durch Zusatz von Acetonitril und/oder Phosphatpuffer (pH = 6,5) führte zu keiner akzeptablen Trennung.

Mono- und Oligosaccharide sowie deren Derivate lassen sich in geeigneter Weise an einer mit einer Aminophase belegten Säule per HPLC trennen. Eine Fraktionierung (Arbeitsanweisung, Kapitel 6.3.3.4) der im Rohpräparat enthaltenen Verbindungen, wie in Abbildung 3.5 ersichtlich, gelingt an einer analytischen Säule mit einer Aminophase. So lässt sich das Säuleneluat in 6 Fraktionen auffangen, gefriertrocknen und näher untersuchen. Die Analyse der einzeln aufgefangenen und anschließend lyophilisierten Fraktionen mit GC-MS zeigt, dass es sich den Fraktionen 1,3 und 4 nicht um Reinsubstanzen handelt. Die in Fraktion 2 aufgefangene Substanz konnte mittels GC-MS nach entsprechender Oximierung und Silylierung als Xylulose-Alanin, die in Fraktion 6 aufgefangene Substanz als Xylose sowohl durch Retentionszeitvergleich als auch über das charakteristische Fragmentierungsmuster identifiziert werden. Bei der Fraktion handelt es sich zwar um eine Reinsubstanz, im entsprechenden Gaschromatogramm der lyophilisierten, oximierten und silylierten Fraktion erscheint ein Peak; eine Identifizierung anhand der Retentionszeit und des Fragmentierungsmuster, das sich durch ein intensives Fragment mit  $m/z = 554$  auszeichnet, ist jedoch nicht möglich. In den Fraktionen 1,3,4 können neben zahlreichen nicht näher untersuchten Verunreinigungen Verbindungen gaschromatographisch getrennt werden, deren Fragmentierungsmuster aus bis zu drei einzelnen, nebeneinander vorkommenden Fragmentierungsreihen bestehen, die von verschiedenen Bruchstücken der jeweiligen gaschromatographisch getrennten Verbindung stammen müssen. Abbildung 3.5 zeigt das entsprechende RI-Chromatogramm der HPLC-Trennung des Rohpräparates mit der Zuordnung der einzelnen Fraktionen.



**Abbildung 3.5**

Chromatogramm (RI-Detektion) einer Trennung eines Xylulose-Alanin-Rohpräparates mit HPLC (Merck LiChrospher 100 NH<sub>2</sub> (250 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm)); getrennte Verbindungen wurden mit Fraktionensammler gesammelt (Fraktionen 1-6), gefriergetrocknet und nach Oximierung (O-Methylhydroxylammoniumchlorid) und Silylierung (MSTFA/TMCS) mittels GC/MS analysiert; in []-Klammern: M<sup>+</sup> des jeweiligen Bruchstückes

Daher ist es denkbar, dass unter den Bedingungen der Oximierung und Silylierung eine oligomere Verbindung in Bruchstücke zerfällt. Häufig ist eine Fragmentierungsreihe als die von Xylose mit dem charakteristischen Fragment  $m/z = 467$ , welches mit dem Molekülpeak von entsprechend oximierter und silylierter Xylose gleichzusetzen ist, identifizierbar. Einige Fragmentierungsreihen ähneln denen von Di- bzw. Oligosacchariden (vgl. hierzu Arbeiten von Molnár-Perl et al. [Lit. 190]). Die Retentionszeit des nach gaschromatographischer Trennung massenspektrometrisch näher untersuchten Peaks im Retentionszeitfenster zwischen Xylit und Trehalose, die meisten gängigen oximierten und silylierten Di- und Oligosaccharide mit Ausnahme von Saccharose eluieren bei den gewählten Trennbedingungen nach der Trehalose von der GC-Kapillarsäule und ein kaum detektierbares Fragment  $m/z = 361$ , das für Oligosaccharide charakteristisch ist, sprechen gegen diese Vermutung. Ob es sich um Bausteine entstandener einfacher Kondensationsprodukte handelt, kann hier nicht geklärt werden. Zur endgültigen Strukturaufklärung der an einer Aminophase aus einem Rohpräparat trennbaren Fraktionen bedarf es einer HPLC-MS/MS-Kopplung bzw. einer Analyse der gesammelten Fraktionen mittels ESI-MS/MS. Da o. g. Strukturaufklärung keine weiteren Erkenntnisse zur Optimierung der Isolierung von Xylulose-Amadori-Verbindungen aus entsprechenden Rohpräparaten durch HPLC an einer Aminophase liefert, wurden diesbezüglich keine weiteren Anstrengungen unternommen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit der klassischen Aufreinigung des Rohpräparates an einem Merck-Lewatit-Kationenaustauscher oder an einer Aminophase (vgl. Abb. 3.5) Xy-

lulose-Alanin mit mäßiger Reinheit aus dem Rohpräparat gewonnen werden kann. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeiten keine geeignete Aminophase für die präparative HPLC zur Verfügung stand, wurde nur mittels Ionenaustauschchromatographie (vgl. Abschnitt I) Xyl-Ala leicht verunreinigt nach Entfernen des Elutionsmittels in kristalliner Form gewonnen. Da Xylulose-Alanin auf die beschriebene Weise präparativ nur in geringen Mengen isoliert werden konnte, kann diese Verbindung nur in beschränktem Maße in Avicel-Modellsystemen eingesetzt werden.

### 3.3.1.6 Strukturaufklärung der gewonnenen gereinigten Xylose-Amadori-Präparate mit GC-MS nach Oximierung und Silylierung

Silylierte Verbindungen mit einem Monosaccharid-Grundkörper zeigen charakteristische Fragmente nach Elektronenstoßionisation, anhand derer unter Ableitung des Molekulgewichts aus dem Molekülpeak  $[M]^+$  eine schnelle Identifizierung unbekannter Verbindungen mit vermuteter Monosaccharidstruktur möglich ist. Es ist jedoch zu beachten, dass häufig der Molekülpeak nur sehr schwach zu erkennen ist, das Fragment  $[M-15]^+$  jedoch ausgeprägter ist.

Tabelle 3.5 gibt einen Überblick über die charakteristischen Fragmente von silylierten Zuckern, bei denen jeweils die Wasserstoffatome aller Hydroxygruppen in Trimethylsilyl (TMS)-Ether umgewandelt wurden.

m/z	Fragment
73	TMS
89	TMS-O
102	TMS-CH <sub>2</sub>
117	TMS-O-CO
147	TMS-O-CH-O-CH <sub>2</sub>
205	TMS-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH-O-TMS
217	TMS-O-CH=CH-CH-O-TMS
218	TMS-O-CH=CH-CH <sub>2</sub> -O-TMS

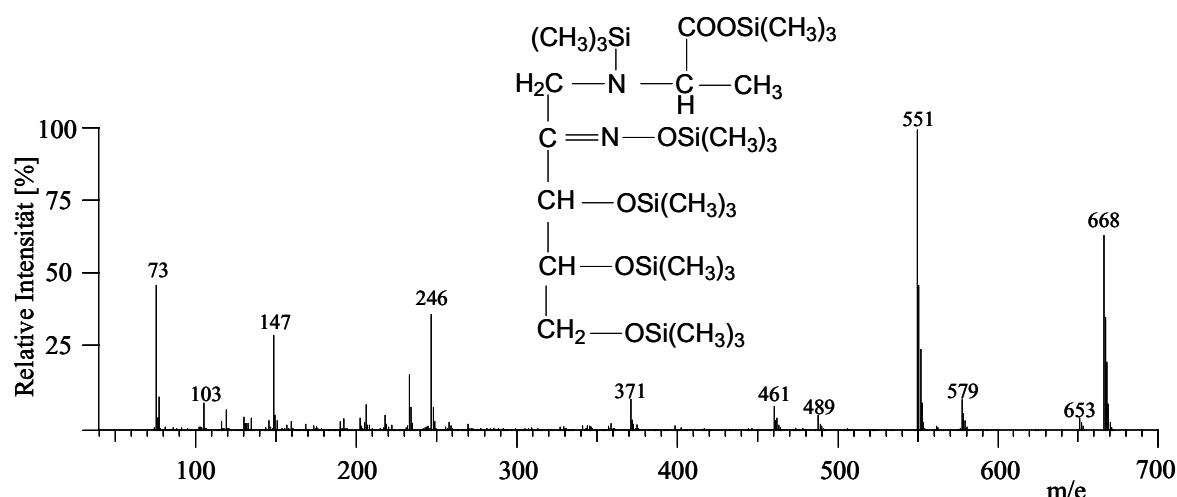
**Tabelle 3.5**

Charakteristische Fragmente von silylierten Verbindungen (TMS-Ether) von Verbindungen mit Monosaccharid-Grundstruktur

#### a) Xylulose-Alanin (auch an der Aminofunktion silyliert)

Anhand des ausgeprägten Molekülpeaks ( $[M^+] = 668$ ) und der charakteristischen Fragmentierung kann man an Hand der Abbildung 3.6 auf die Struktur des silylierten im GC-MS-EI-Chromatogramm der Abbildung 3.4 dargestellten *syn*- und *anti*-Oxims, welches zusätzlich am H-Atom der Aminogruppe silyliert ist, schliessen. Es sind zahlreiche, für TMS-Ether von Zuckern charakteristische Fragmente (vgl. Tabelle 3.5) sowie weitere durch  $\alpha$ -Spaltung und



**Abbildung 3.6**

Massenspektrum von derivatisiertem, zusätzlich an der Aminofunktion silyliertem Xylulose-Alanin (1-Desoxy-1-alanyl-xylulose), aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid, Silylierung mit MSTFA-TMCS; genaues Fragmentierungsschema siehe Anhang unter 8.4.4

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
670	12,541	
669	19,779	
668	30,490	$[\text{M}]^+$
653	2,789	$[\text{M}-15]^+$
652	0,564	
651	0,250	
580	4,775	
579	7,362	$[\text{M}-89]^+$
554	7,150	
553	23,123	
552	37,576	
551	70,618	$[\text{M}-117]^+$
489	5,913	
463	4,718	$[\text{M}-205]^+$
218	4,223	
217	9,784	
205	16,594	
147	61,655	
117	12,934	
103	20,167	
73	100	

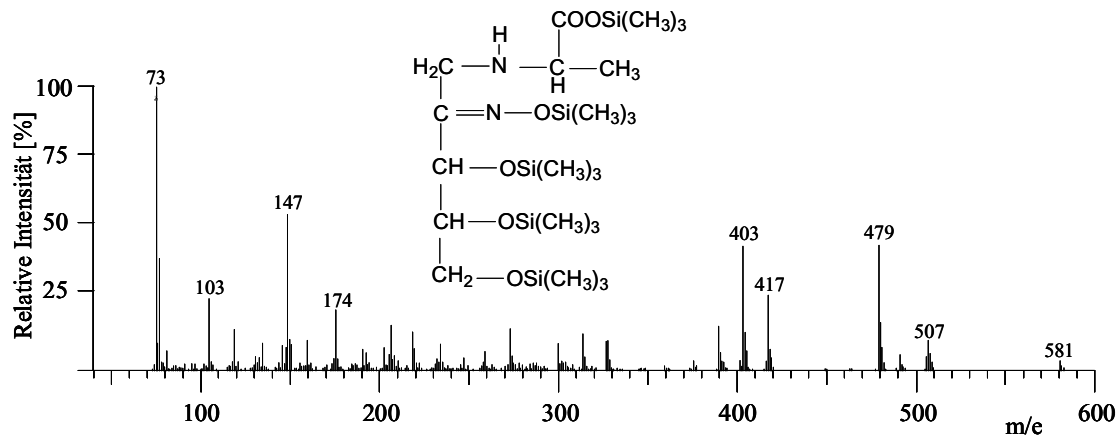
**Tabelle 3.6**

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI des zusätzlich an der Aminogruppe silyliertem TMS-Derivates von 1-Desoxy-1-alanyl-xylulose

McLafferty-Umlagerung entstandene Fragmente erkennbar. Die für diese silylierte Pentose-Amadori-Verbindung charakteristische Intensitätsverteilung der Fragmente ist in Tabelle 3.6 zu sehen. Anhand verschiedener für Verbindungen mit Monosaccharid-Grundstruktur charakteristischer Massendifferenzen des Fragmentes mit dem höchsten Masse-Ladungsverhältnis ( $m/z = 668$ ) zu weiteren detektierten Fragmenten, kann man auf das derivatisierte Xyl-Ala mit der Molekülmasse 668 schließen.

### b) Xylulose-Alanin (an der Aminofunktion nicht silyliert)

Das an der Aminofunktion nicht zusätzlich silylierte *syn*- und *anti*-Oxim des Xylulose-Alanins hat ebenfalls, wie in Abbildung 3.7 zu sehen, ein charakteristisches Fragmentierungsmuster.



**Abbildung 3.7**

Massenspektrum von derivatisiertem, an der Aminofunktion nicht silyliertem Xylulose-Alanin (1-Desoxy-1-alanyl-xylulose), aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70 eV, Scan 50 - 700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid, Silylierung mit MSTFA-TMCS; genaues Fragmentierungsschema siehe Anhang unter Kapitel 8.4.2

detektiertes m/z =	Intensität	Charakteristisches Fragment
584	0,189	
583	0,610	
582	1,164	
581	2,292	[M-15] <sup>+</sup>
507	8,024	[M-89] <sup>+</sup>
481	6,888	
480	11,859	
479	31,033	[M-117] <sup>+</sup>
419	3,151	
418	6,793	
417	21,505	
405	6,159	
404	11,634	
403	32,775	
391	3,379	[M-205] <sup>+</sup>
218	6,8004	
217	16,532	
205	11,809	
147	55,679	
117	15,725	
103	29,886	
73	100	

**Tabelle 3.7**

Intensitätsverteilung der Fragmente nach GC-MS-EI an der Aminofunktion nicht silylierten TMS-Derivates von 1-Desoxy-1-alanyl-xylosulose, [M]<sup>+</sup> kann kaum detektiert werden

Anhand der für silylierte Verbindungen mit Monosaccharid-Grundkörper charakteristischen Fragmente ist u.a. das Fragment mit m/e = 507 aus der Abspaltung einer Trimethylsilyl-Ether-Gruppe (TMS-O) aus dem radikalischen Molekülkation [M]<sup>+</sup> zu deuten. Das Fragment mit

$m/e = 581$  ist damit nicht das Molekülion, sondern aus Abspaltung einer Methylgruppe aus diesem ( $[M-15]^+$ ) entstanden.

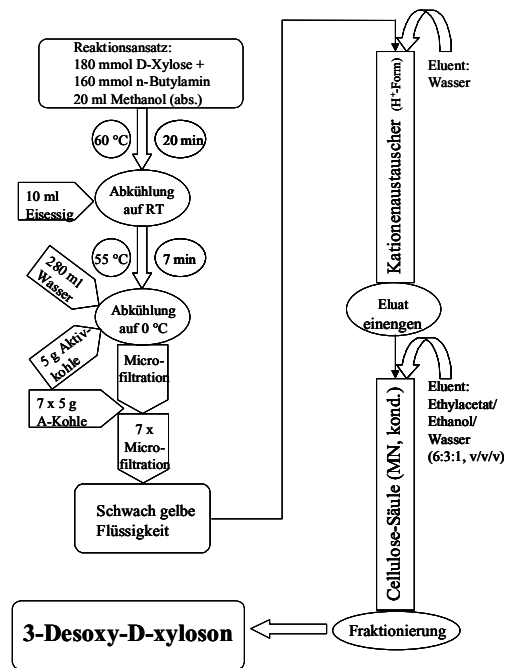
Die für diese silylierte Pentose-Amadori-Verbindung charakteristische Intensitätsverteilung der Fragmente ist in Tabelle 3.7 zu sehen.

### 3.3.2 Versuch einer Synthese von 3-Desoxypentosulosen und 1-Desoxypentodiulosen

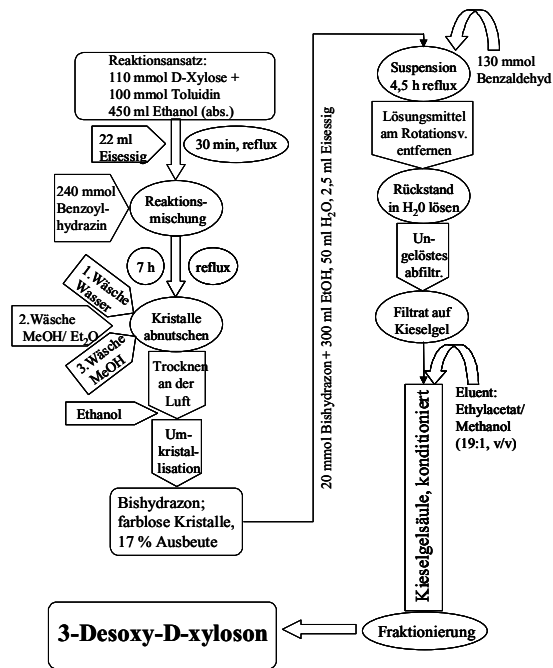
Der Einsatz von 3-Desoxypentosulosen und 1-Desoxypentodiulosen in den zu untersuchenden kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ist von Interesse, da diese beiden Abbauprodukte von Pentose-Amadori-Verbindungen direkte Edukte des Strecker-Abbaus sind und somit entscheidend an der Bildung von Pyrazinen und Pyridinen, die mit Kreatinin und Strecker-Aldehyden zu entsprechenden HAAs kondensieren können (vgl. Bildungswege Kapitel 1.1.3), beteiligt sind.

Die Synthese der 3-Desoxyosone von Hexosen wird u. a. von Wittmann [Lit. 314] beschrieben. Hierbei wird Glucose mit *n*-Butylamin in Methanol unter Rückfluss umgesetzt. Entstehende Reaktionsprodukte werden durch mehrstufige Säulenchromatographie weiter aufgereinigt. Dabei erfolgt die Abtrennung des Butylamins durch Ionenaustauschchromatographie an einem stark sauren Kationenaustauscher. Die Isolation des 3-Desoxyoson der D-Glucose (3-Desoxy-D-erythro-glucos-2-ulose) erfolgt durch präparative Cellulose-Säulenchromatographie. Die die gewünschte Verbindung enthaltenden Fraktionen werden vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels und Gefriertrocknung erhält man ein weißlich kristallines Pulver von hoher Reinheit (vgl. Wittmann [Lit. 314]), bestehend aus dem 3-Desoxyoson der Glucose.

Eine im Prinzip und im Ablauf ähnliche Synthese der 3-Desoxyosone von Pentosen beschreibt Kato in einer Publikation bereits 1962 [Lit. 126]. Der Verlauf der Synthese ist in Abbildung 3.8 dargestellt. Eigene Arbeiten zeigten, dass die von Kato beschriebene Synthese so nicht anwendbar ist. Die Reaktionslösung lässt sich auch nach mehrmaligem Versetzen mit Aktivkohle (über Nacht) nicht entfärben, so dass davon auszugehen ist, dass wasserlösliche polymere Bräunungsprodukte in der noch weiter aufzureinigenden Reaktionslösung in größeren Mengen vorliegen. Diese können dann im Weiteren auch an den Kationenaustauscher binden, dessen Kapazität dann schnell erschöpft ist. Diese Verunreinigungen beeinträchtigen auch erheblich die nachfolgende Säulenchromatographie an aktivierter Cellulose (vgl. Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.4). Der Säulenauslauf war durchgehend goldgelb gefärbt.



**Abbildung 3.8**  
Komplexe Synthese des 3-Desoxyosons der Xylose nach Kato [Lit. 126]



**Abbildung 3.9**  
Komplexe Synthese des 3-Desoxyosons der Xylose nach Glomb [Lit. 65]

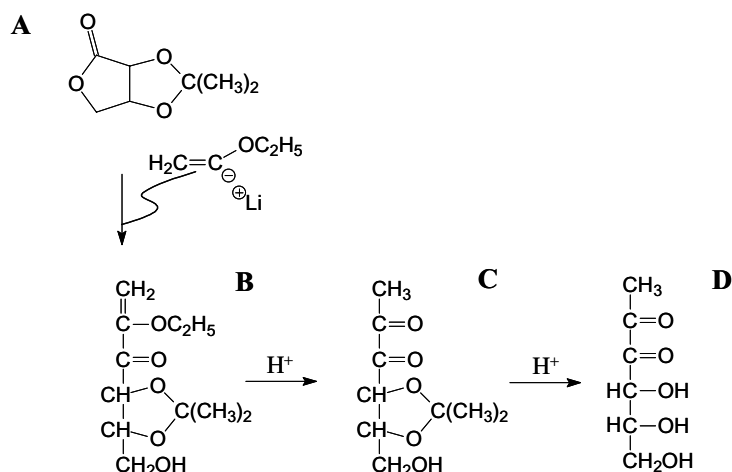
In den einzelnen oximierten und silylierten Fraktionen, denen vorher am Rotationsverdampfer das Lösungsmittel entzogen wurde und anschließend die gefriergetrocknet wurden, konnte jedoch keine 3-Desoxyxylose nachgewiesen werden.

Dagegen lässt sich in den einzelnen Fraktionen das 2-Xylosulose neben Begleitstoffen nachweisen. Der Nachweis erfolgt als Silylierungsprodukt ( $m/z = 538$ ) und als Chinoxalinderivat ( $m/z = 436$ ) (Chromatogramme finden sich unter Kapitel 8.6) nach Umsetzung des Präparates mit o-Phenylendiamin, Entfernung des Methanols im Gasstrom und anschließender Silylierung. Das 2-Xylosulose könnte aus der Oxidation der möglicherweise sehr instabilen, aus Xylose und Butylamin intermediär gebildeten Amadori-Verbindung entstanden sein, obwohl das Reaktionsgemisch während der Erhitzung und der Reinigung mit Aktivkohle unter N<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten wurde.

Im Rahmen seiner Arbeiten zur Dissertation hat Glomb [Lit. 68] 3-Desoxy-D-xylosulose synthetisiert. Die Synthese unterscheidet sich deutlich von der von Kato beschriebenen Methode (vgl. Abb. 3.8). Die Reaktionsführung läuft hierbei über entsprechende Bisbenzoylhydrazone. Deren Verwendung zur Synthese von Dicarbonylverbindungen wurde erstmals von El Khadem et al. [Lit. 46, 47, 48] und später von Madson und Feather [Lit. 164] beschrieben. Dabei wird zunächst die reaktive Verbindung (reduzierender Zucker) mit Benzoylhydrazin in ein stabiles, leicht isolierbares Derivat überführt. Das Bishydrazon kann dann vom Reaktionsgemisch abgetrennt und die Schutzgruppe mit Benzaldehyd wieder abge-

spalten werden. Da Glomb mit dieser Aufarbeitung keine zufriedenstellenden Ausbeuten an 3-Desoxypentosulose erhielt, modifizierte er die Synthese nach Madson und Feather. Ein Fließschema dazu ist in Abbildung 3.9 zu sehen. Mit dieser modifizierten Methode gelang es Glomb, eine für seine weiteren Arbeiten ausreichende Menge an 3-Desoxylulose zu synthetisieren. In NMR-Experimenten konnte er eine ausreichende Reinheit nachweisen.

Entsprechende 1-Desoxyhexulosen sind nicht leicht zugänglich. In der Literatur wird häufig eine Darstellung mit 1-Desoxypiperidino-fructose als Zwischenstufe zur Synthese des entsprechenden, durch Reaktion mit OPD gebildeten Chinoxalins des 1-Desoxyosons der D-Glucose beschrieben [Lit. 304]. Die underivatisierte Form des jeweiligen 1-Desoxyosons kann aber auf keiner der Synthesestufen gewonnen und isoliert werden. Eine Synthese, die zum reinen 1-Desoxyoson führt, gelang erstmals Glomb [Lit. 65, 66]. Hierbei wird ausgehend vom 2,3-O-Isopropyliden-D-erythronolacton (Abb. 3.10, A) eine Acylgruppe einkondensiert, sodass man ein C<sub>6</sub>-Grundgerüst erhält. Aktives Additions-Reagenz ist hierbei Ethoxyvinyl-lithium. Nach mehrstufigen Arbeitsschritten, bestehend aus Extraktion, Hochvakuumdestillation und Säulenchromatographie, erhält man ein reines Isopropylidenaddukt (B). Dieser Vinylother ist säurelabil und lagert sich in das entsprechende Carbonylderivat (C) um. Die Isopropylidenschutzgruppe kann in Gegenwart eines stark sauren Kationenaustauschers entfernt werden, sodass das 1-Desoxyoson der D-Glucose (1-Desoxy-D-erythro-gluco-2,3-diulose, D) in freier Form in Lösung vorliegt.



**Abbildung 3.10**

Komplexe Synthese des 1-Desoxyosons von Hexosen nach Glomb

Diese Synthese ist nicht analog auf 1-Desoxyosone von Pentosen übertragbar. Um einen C<sub>5</sub>-Grundbaustein zu bekommen, kann man nicht das um eine Methyleneinheit verkürzte 2,3-O-Isopropyliden-D-erythronolacton einsetzen, da dies zu einem ganz anderen Kondensationsprodukt reagieren würde. Eine umfassende Literatur- und Substanzrecherche ergab kei-

nen Hinweis auf diese hypothetische Ausgangsverbindung. Alternativ ist eine Kondensation eines C1-Körpers an das 2,3-O-Isopropyliden-D-erythronolacton zu einem C<sub>5</sub>-Grundgerüst durch eine Aldolkondensation mit Formaldehyd denkbar. Formaldehyd besitzt jedoch eine hohe Reaktivität und würde mit einem möglichen Folgeprodukt sofort reagieren. Eine Darstellung eines reinen 1-Desoxyosons von Pentosen ist somit nach dem heutigen Stand der Wissenschaft nicht möglich und wurde deshalb in den eigenen Arbeiten nicht durchgeführt.

Da das 3-Desoxyoson der Xylose aus der Synthese nach Glomb nur in äußerst geringer Ausbeute erhalten wird, für die Modellversuche aber Mengen im 100 mg-Maßstab benötigt würden, wurde auf den Einsatz von Desoxyosonen als Modellkomponenten verzichtet.

### **3.4 Analysenverfahren zur Erfassung der bei Erhitzung und Lagerung von Modellsystemen gebildeten Reaktionsprodukte**

#### **3.4.1 Erfassung des Bräunungsverhaltens zur Beschreibung der fortschreitenden Maillard-Reaktion**

Den Grad der fortschreitenden Maillard-Reaktion kann man an der Menge entstandener Bräunungsprodukte abschätzen. Um Rückschlüsse auf ablaufende Reaktionen während der Maillard-Reaktion ziehen zu können, ist es nicht nur wichtig, die Bräunung bzw. die Bräunungsintensität an einem definierten Endpunkt zu betrachten, sondern auch den Bräunungsverlauf in Abhängigkeit verschiedener Parameter als dynamischen Prozess zu sehen. Ein einfaches Verfahren zur Beurteilung des Verlaufes von Bräunungsreaktionen in Modellsystemen ist die photometrische Vermessung eines wässrigen Analysenprobenextraktes. Hierzu wird die Extinktion in einem Wellenlängenbereich, der etwa im Absorptionsbereich der wasserlöslichen Anteile der braunen Polymerisationsprodukte liegt, bestimmt [Lit. 31, 41, 278]. Eine Vertiefung der braunen Farbe korreliert mit einem Anstieg der Extinktion im Wellenlängenbereich von 400 nm bis 550 nm. Meistens wird eine Messwellenlänge von  $\lambda = 420$  nm verwendet. Durch den Einsatz eines selbstregistrierenden Photometers (Scan-Funktion) ist es darüber hinaus möglich, den gesamten Wellenlängenbereich von 200 - 700 nm aufzunehmen. Im Wellenlängenbereich unter 300 nm besitzen weitere mögliche Reaktionsprodukte der eingesetzten Zucker (Furfural und -derivate, Pyrazine und Pyrrole) ein Absorptionsmaximum; daraus lassen sich Hinweise auf die mögliche Entstehung dieser für die HAA-Bildung wichtigen Zwischenstufen gewinnen.

Bereits Jägerstad et al. [Lit. 112] nutzten die Messung der Bräunung bei  $\lambda = 375$  nm als Messgröße für die Menge an Maillard-Reaktionsprodukten in einfachen Modellsystemen auf

Fleischbasis mit unterschiedlichem Kreatiningehalt. Die Intensität der Bräunung korrelierte dabei gut mit der Anzahl an Revertanden in einem parallel durchgeführten Ames-Test.

Die Bräunungsmessung ist einfach durchzuführen, da eine einmalige Extraktion mit Wasser und eine Abtrennung unlöslicher Bestandteile durch Zentrifugation ausreichend sind, um reproduzierbar wasserlösliche Bräunungsprodukte zu extrahieren. Auf eine sonst von anderen Autoren beschriebene Membranfiltration kann verzichtet werden (siehe Arbeitsanweisung, Kapitel 6.10.1).

### 3.4.2 Abfangreaktionen von Zwischenstufen der Maillard-Reaktion

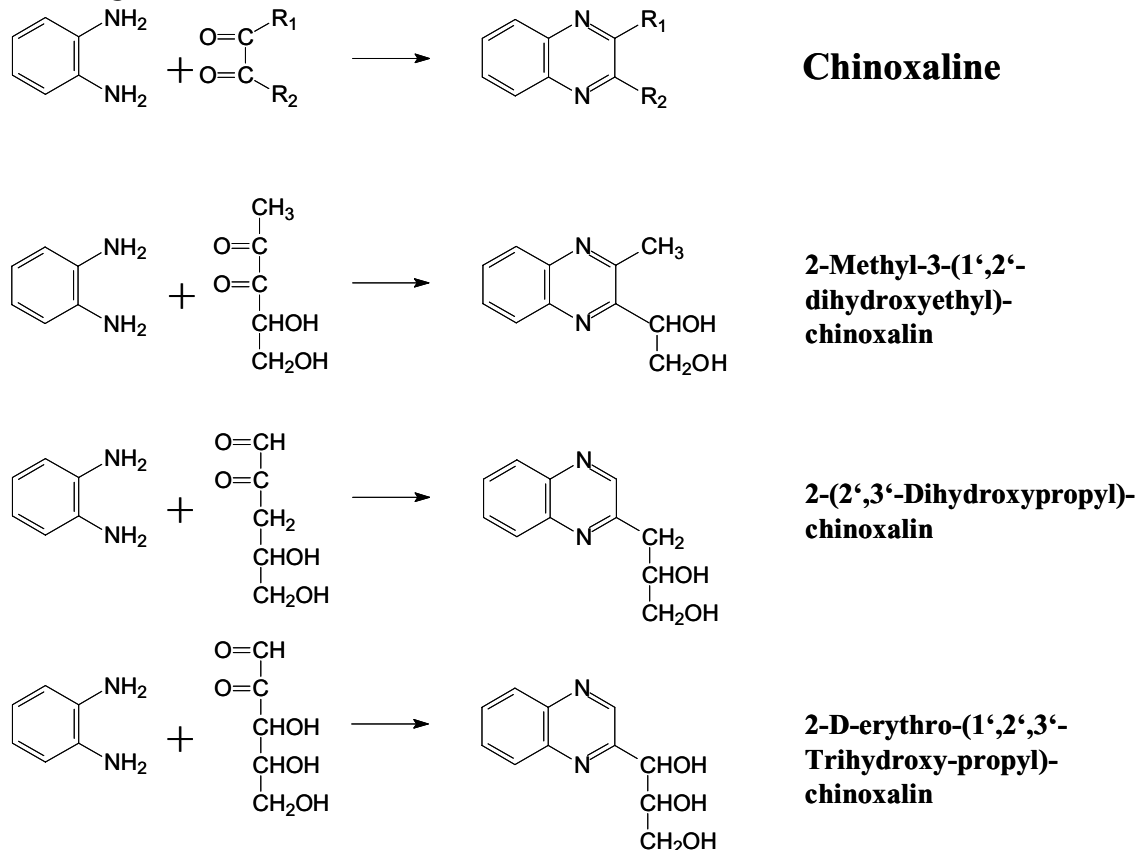
Viele Zwischenstufen der Maillard-Reaktion sind sehr instabil und reaktiv. Da die meisten Reaktionswege der Maillard-Reaktion über äußerst reaktive  $\alpha$ -Dicarbonyle verlaufen, ist es für eine genauere analytische Erfassung wichtig, diese in eine stabile Form zu überführen. Für solche Zwecke ist es sinnvoll, Abfangreaktionen mit Trapping-Reagenzien zu nutzen. Das Abfangreagenz sollte dabei selbst stabil sein, stabile Produkte bilden und selektiv mit den  $\alpha$ -Dicarbonylen reagieren. Die dabei entstehenden Derivate haben häufiger günstigere chromatographische Eigenschaften als die z. T. sehr polaren  $\alpha$ -Dicarbonyle.

o-Phenylendiamin (OPD) hat sich als Reagenz zum Abfangen von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen besonders bewährt. Als Produkte resultieren dabei die entsprechenden Chinoxaline, wie in Abbildung 3.11 zu sehen. Diese sind sehr stabil und lassen sich sowohl in acetylierter als auch in silylierter Form gaschromatographisch selbst im Spurenbereich sicher nachweisen. [Lit. 192, 193]. Da die Umsetzung von OPD mit Verbindungen, die entsprechende  $\alpha$ -Dicarbonylstrukturen aufweisen, quantitativ erfolgt, ist es möglich, sie mit einem Flammenionisationsdetektor nach gaschromatographischer Trennung (GC-FID) quantitativ zu bestimmen [Lit. 159]. Der zu einem beliebigen Zeitpunkt bestimmte Gehalt an Chinoxalinderivaten entspricht der Summe der während der Reaktionsführung gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen bei den gegebenen Reaktionsbedingungen. Die gebildeten Chinoxaline sind UV-aktiv. Ihre quantitative Bestimmung nach Trennung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an chemisch gebundenen Umkehrphasen (RP-HPLC) mit nachgeschalteter UV/Vis-Detektion ist ebenfalls problemlos möglich [Lit. 99]. Die Abfangreaktion gelingt in wässrigen Reaktionsmedien innerhalb eines weiten pH-Bereiches [Lit. 237]. Auch zur Klärung von Reaktionen in vivo wurde OPD erfolgreich eingesetzt [Lit. 216].

Die Arbeiten von Liedke [Lit. 159] zeigten, dass mikrokristalline Cellulose (Avicel), das verwendete Trägermaterial für wasserarme Modellsysteme, sich gegenüber dem OPD inert ver-

hält. Selbst bei zehnfachem Überschuss an OPD in Bezug auf die Trägermatrix konnten nach dem Erhitzen keine Chinoxaline nachgewiesen werden. Somit kann OPD in einer so genannten „Eintopfreaktion“ neben anderen Modellbestandteilen dem Avicel definiert beigemischt werden. Ein derartiges Modellsystem kann dann unter definierten Bedingungen (Gleichgewichtsfeuchtigkeit, Temperatur) sowohl gelagert als auch erhitzt werden.

Abbildung 3.11



Bildung von Chinoxalinen aus  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit ortho-Phenyldiamin (OPD) (1. Zeile),  
 Bildung der Chinoxalinderivate des 1-Desoxyosons und des 3-Desoxyosons der Xylose (2. und 3. Zeile),  
 Bildung des Chinoxalinderivats des D-Xylosons (4. Zeile)

Mittels o-Phenyldiamin ist es also möglich, die komplexen Reaktionswege der Maillard-Reaktion durch Erfassung der intermediär entstandenen  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen näher zu beschreiben. So gelang Beck et al. [Lit. 20] z. B. der Nachweis von 1-Desoxydiketosen über den Nachweis der entsprechenden Chinoxaline. Kawakishi [Lit. 129] konnte die Bildung des Glucosons beim oxidativen Abbau von Amadori-Verbindungen durch Umsetzung der entsprechenden Reaktionsgemische mit OPD nachweisen und die Bildungsrate bestimmen. Ganze Reaktionsspektren konnten so näher beleuchtet werden. Beim Nachweis Chinoxalinen sollte immer sichergestellt werden, dass es sich nicht um Artefakte handelt. Da OPD selbst zwei freie Aminogruppen im Molekül trägt, besteht die Möglichkeit, dass der Abbau von reduzierenden Zuckern beschleunigt werden könnte. Die Bildung einer SCHIFF'schen Base mit der



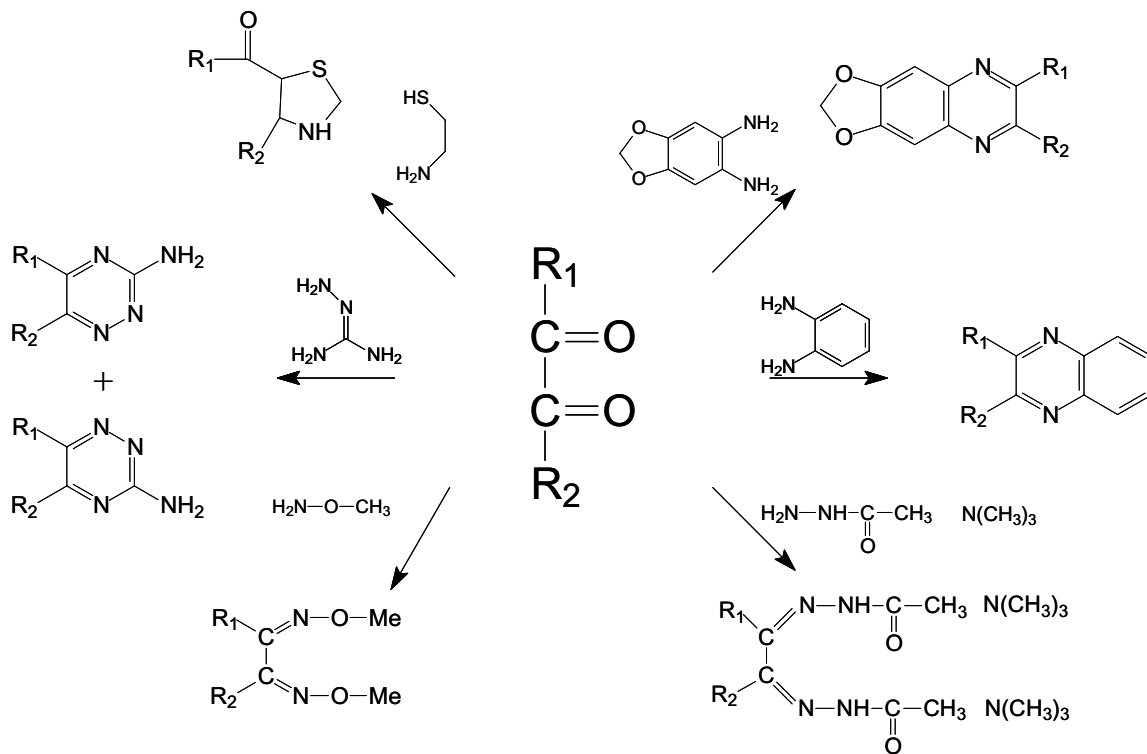
entsprechenden Carbonylstruktur der Zucker als Reaktionspartner ist denkbar. Diese Reaktivität wird jedoch durch den aromatischen Rest teilweise herabgesetzt.

Glomb [Lit. 67] beobachtete während seiner Arbeiten, dass die Chinoxalinderivate der 1-Desoxyhexodiulosen und von Glucoson nach 3 Wochen Lagerung bei Raumtemperatur in verschlossenen Gefäßen um etwa 80 % abgebaut worden sind, im Gegensatz den zu stabilen Chinoxalinen der 3-Desoxyhexosulosen. Der genaue Abbaumechanismus ist noch nicht bekannt, da mögliche Abbauprodukte nicht identifiziert werden konnten. Die Nutzung von OPD für Langzeit-Lagerungsversuche ist wegen der Instabilität bestimmter Intermediate daher nur eingeschränkt möglich.

Weiter ist zu beachten, dass in Gegenwart von Luftsauerstoff die elektronenreiche  $\alpha$ -Diaminstruktur von OPD leicht zu einem Chinoximin aufoxidiert werden kann. Chinoximine könnten Amadori-Verbindungen in einer Redoxreaktion oxidieren. Unter ungünstigen Bedingungen könnte das detektierte Hexoson bzw. Pentoson vollständig als Artefakt aus der Wechselwirkung des Amadori-Produktes mit dem Abfangreagenz resultieren. Bei einigen Reaktionsansätzen kann es daher sinnvoll sein, nicht im Sinne einer „Eintopfreaktion“ OPD schon zu Beginn als Modellkomponente zuzufügen, sondern eine „Postderivatisierung“ durchzuführen. Dabei wird die Abfangreaktion unmittelbar nach Ablauf der Reaktion des Modellsystems durchgeführt. Sehr instabile Intermediate können jedoch dann unter Umständen nicht miterfasst werden, weil sie während der Reaktionsführung sofort zu Folgeprodukten abreagieren. Zur näheren Untersuchung, ob derartige störende Nebenreaktionen auch im großen Maße bei Abbauprodukten von Pentosen zu beobachten sind, ist es daher notwendig, geeignete Referenzsubstanzen sowohl von den  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen der Pentosen als auch von den entsprechenden OPD-Derivaten zu synthetisieren.

Außer mit OPD als Abfangreagenz reagieren  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit O-Methylhydroxylamin, Hydrazinen (z. B. Girad T-Reagenz in Trimethylamin), Cysteamin, 1,2-Diamino-4,5-methylendioxybenzol (DMB) und Aminoguanidin zu Oximen, Osazonen, Thiazolidinen, fluoreszierenden DMB-Derivaten und 3-Amino-1,2,4-triazinen (vgl. Abb. 3.12). Die genannten Verbindungen könnten grundsätzlich analog zum OPD als Abfangreagenzien für Carbonylverbindungen eingesetzt werden. Ein Bis(dinitrophenyl)hydrazonderivat vom 3-Desoxyoson der Xylose konnte Kato [Lit. 127] bereits im Jahr 1960 erfassen.

Eine wirkliche Alternative bildet hierbei jedoch nur die Nutzung von Aminoguanidin als Abfangreagenz [Lit. 314]. Aminoguanidin bildet mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen Triazine, die zur HPLC direkt und nach geeigneter Derivatisierung zur GC-FID eingesetzt werden können.

**Abbildung 3.12**

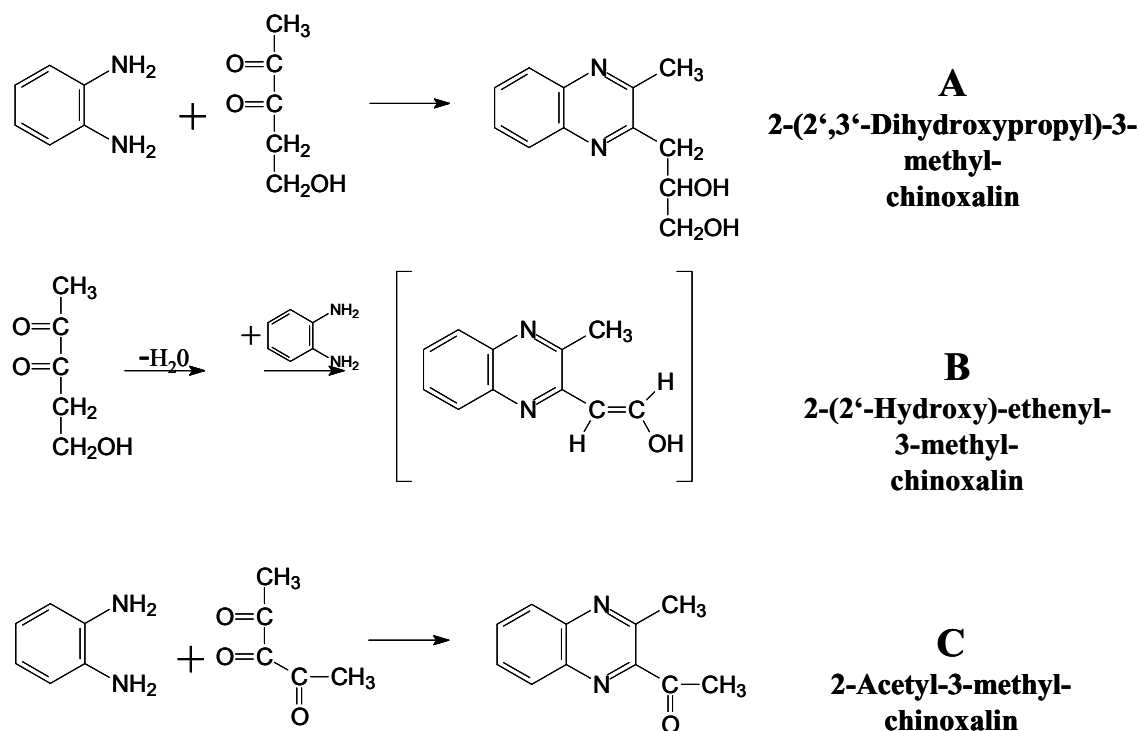
Abfangreagenzien, die Addukte mit  $\alpha$ -Dicarbonylstrukturen bilden (nach Glomb [Lit 67])

Aminoguanidin ist zwar toxisch unbedenklicher als OPD, bildet aber aufgrund seiner Molekülasymmetrie ein racemisches Produktgemisch für jedes  $\alpha$ -Dicarbonyl. Eine analytische Auswertung wird dadurch erheblich erschwert.

### 3.4.2.1 Abfangreaktionen mit OPD in zuckerreichen Modellsystemen

Nedvidek [Lit. 206] untersuchte erstmals  $\alpha$ -Dicarbonylzwischenstufen der Maillard-Reaktion aus gepufferten Modellansätzen, bestehend aus Xylose und Weizenkleberhydrolysat. Er konnte dabei die aus der Abfangreaktion des OPD mit dem 1-Desoxyoson bzw. dem 3-Desoxyoson der Xylose entstandenen Chinoxaline nachweisen. Diese von der Xylose ableitbare Desoxyosone wurden bereits von Morita et al. [Lit. 192] in Form ihrer Chinoxalinderivate in alkalischen Glucose- und Maltose-Ansätzen, die mit OPD versetzt worden sind, nachgewiesen. Auch in sauren Xylose-Ansätzen [Lit. 191] konnte das entsprechende 3-Desoxyoson nachgewiesen werden. Daneben konnte Nedvidek aus den Reaktionsansätzen mit Xylose noch drei weitere Chinoxalinderivate isolieren und durch Massenspektrometrie und NMR absichern (vgl. Abb. 3.13). So gelang es ihm, das Chinoxalin des 1,4-Didesoxyosons der Xylose (2-(2'-Hydroxyethyl)-3-methylchinoxalin, Verbindung A in Abb. 3.13), das mit OPD umgesetzte Dehydratisierungsprodukt des 1,4-Didesoxyosons der

Xylose (2-Ethenyl-3-methylchinoxalin, Verbindung B in Abb. 3.13) sowie das 2,3,4-Pentatrin der Xylose, welches eine hohe Reaktivität aufweist, in Form seines OPD-Abfangproduktes (2-Acetyl-3-methylchinoxalin, Verbindung C in Abb. 3.13) nachzuweisen. Zunächst ließ sich die Bildung des Pentatrin nicht erklären. Unter Einbeziehung neuerer Erkenntnisse ist es jedoch heute denkbar, dass das Pentatrin nach Cyclisierung, Enolisierung und Spaltung der C-O-Bindung in Position 5 des 1-Desoxyosons der Xylose entsteht (nach Severin et al. [Lit. 252]).



**Abbildung 3.13**

Weitere, von Nedvidek in Xylose-Reaktionsansätzen gefundene Chinoxalinderivate der Abbauprodukte von Pentosen

Die beschriebenen Beobachtungen und Erkenntnisse beruhen auf Experimenten in (z. T. gepufferter) wässriger Lösung. Erkenntnisse aus wasserarmen glucosehaltigen Modellsystemen unter Zuhilfenahme von OPD als Abfang-Reagenz werden in den Arbeiten von Liedke [Lit. 159] detailliert dargestellt. Sowohl die über Enolisierungsreaktionen erfolgende Bildung von entsprechenden  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen aus durch Reaktion von Glucose mit Amino-Verbindungen entstandenen Amadori-Verbindungen als auch die Bildung des Glucosons während ihres oxidativen Abbaus werden beschrieben. Analoge Erkenntnisse über den Abbau von möglicherweise nur intermediär vorkommenden, unter Beteiligung von Pentosen gebildeten Amadori-Verbindungen fehlen. Der Einsatz des Abfang-Reagenzes OPD in wasserarmen pentosehaltigen Systemen ist in der Literatur nicht beschrieben.

Im Rahmen dieser Arbeit soll versucht werden, diese fehlenden Erkenntnisse durch Untersuchung geeigneter wasserarmer Modellsysteme zu gewinnen. Hierzu werden Pentose und Aminosäuren enthaltende sowie Pentose, Aminosäure und Kreatinin enthaltende wasserarme Modellsysteme auf Avicel-Basis untersucht. Dabei werden die Modellsysteme während einer definierten Lagerzeit auf eine bestimmte Gleichgewichtsfeuchtigkeit eingestellt und anschließend unter definierten Bedingungen erhitzt. Das Abfangreagenz o-Phenylendiamin (OPD) wird sowohl im Sinne einer „Eintopfreaktion“ bereits bei der Herstellung der Modellsysteme zugesetzt als auch nachträglich mit der entsprechenden Reaktionslösung inkubiert („Postderivatisierung“).

### **3.4.2.2 Analytik von Chinoxalinen und weiteren OPD-Addukten aus wasserarmen Modellsystemen**

Eine sichere Erfassung von Verbindungen mit  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur nach Umsetzung mit OPD setzt eine spezifische Detektion der Chinoxaline in verschiedenen Matrices voraus. Routinemäßig wird von vielen Arbeitsgruppen seit langem die HPLC an chemisch gebundenen Umkehrphasen angewandt. Bereits im Jahr 1972 erarbeiteten Morita und Takagi [Lit. 194] eine serientaugliche HPLC-Trennung von Chinoxalinen aus wässriger Matrix an einer RP-18-Phase mit einem Methanol-Acetonitril-Wasser-Eluenten. In neueren Forschungsarbeiten wird ein Acetonitril-Ammoniumformiat-Eluent bevorzugt. Die Detektion kann sowohl mit UV/Vis-Absorptionsdetektoren bei einer festgelegten Wellenlänge ( $\lambda = 320$  nm) erfolgen als auch innerhalb eines bestimmten Wellenlängenbereichs unter Aufnahme eines Spektrums (HPLC-DAD) stattfinden.

Die Vorteile der Aufnahme eines breiten Wellenlängenbereiches liegen in der Möglichkeit, die Spektren der einzelnen Chinoxaline mit Bibliotheksdatenbanken abzugleichen, sowie in der relativ leichten Erkennung von Verunreinigungen. Die anzuwendende Analytik sollte zwar primär auf die Bestimmung von Umsetzungsprodukten der Reaktionsintermediate mit dem OPD zugeschnitten sein, jedoch ist es von Vorteil, im Rahmen einer Multimethode auch Ausgangssubstanzen und weitere Produkte zu erfassen. Zwar kann man zur weiteren Charakterisierung der Chinoxaline und weiterer Nebenprodukte eine HPLC-ESI-MS/MS-Kopplung einsetzen; auf diese Weise können jedoch aufgrund der speziellen Belegung und dem damit eingeschränkten Polaritätsbereich der eingesetzten HPLC-Säule sowie der damit verbundenen eingeschränkten Laufmittelauswahl häufig nur eine begrenzte Anzahl von Substanzen so getrennt werden, dass sie optimal massenspektrometrisch bestimmt werden können.

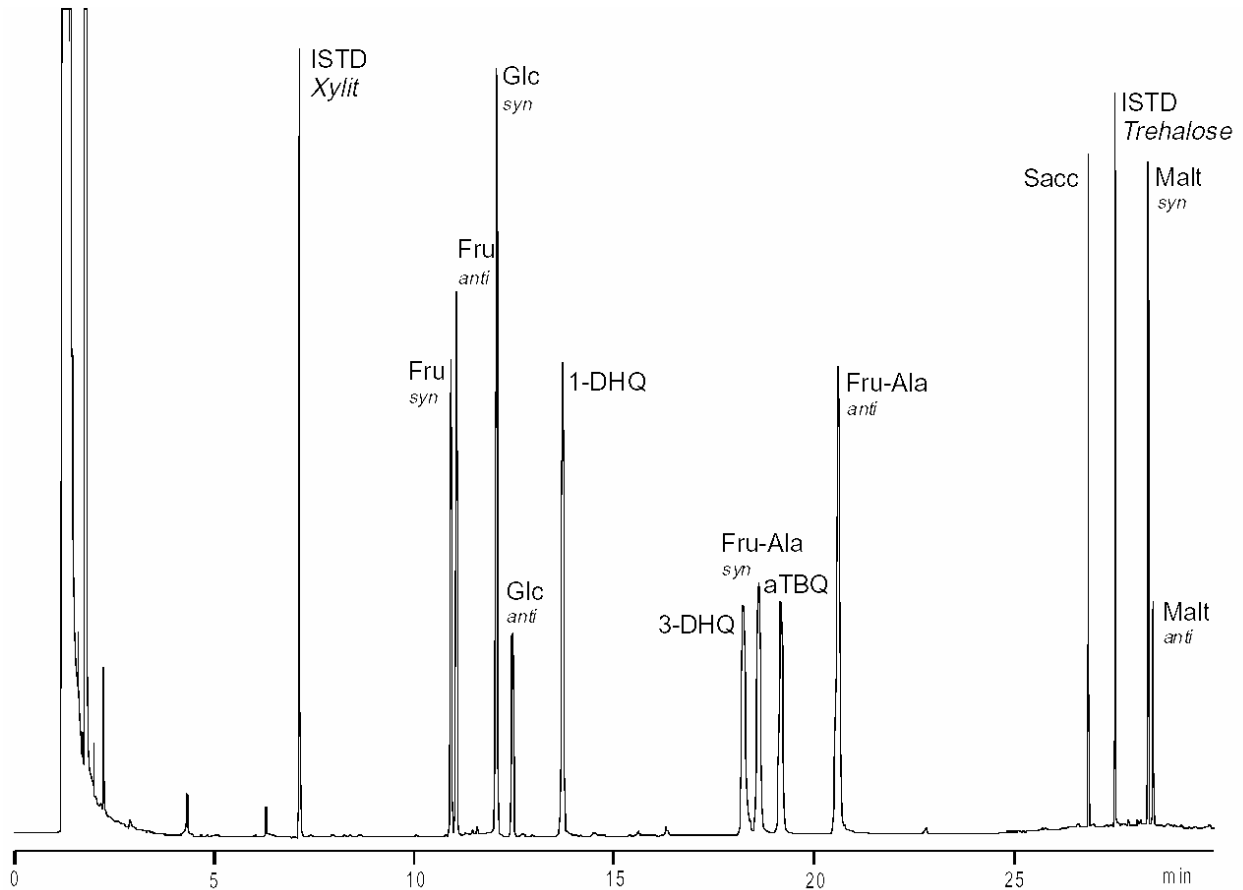
Der Einsatz der Gaschromatographie zur Bestimmung der Chinoxaline in Form ihrer stabilen Trimethylsilyl- bzw. Acetylderivate ist weit verbreitet (vgl. Arbeiten von Nedvidek [Lit. 206], Kawakishi [Lit. 130], Liedke [Lit. 159] und Roussev [Lit. 239]). Beide Derivatisierungsvarianten sind im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit gleichwertig.

Zur Bestimmung der im Reaktionsgemisch gebildeten Amadori-Verbindungen wird die von Wittmann [Lit. 314] entwickelte Methode zur Bestimmung von Amadori-Verbindungen mittels Gaschromatographie nach Derivatisierung zu den Oximen und deren Trimethylsilylethern eingesetzt. Mit der hierbei angewandten Multimethode können gleichzeitig in einem Lauf auch entsprechend derivatisierte Mono- und Disaccharide sowie die Trimethylsilyl-Derivate der zu bestimmenden Chinoxaline klar voneinander getrennt werden (vgl. Arbeitsvorschrift Kapitel 6.8.3.2). In dem in Abbildung. 3.14 dargestellten Gaschromatogramm (Liedke [Lit. 159]) lassen sich unterschiedliche Zeitfenster erkennen, in denen jeweils eine bestimmte Verbindungsklasse detektiert wird. Bei der Gaschromatographie entsprechender acetylierter Komponenten ist diese einfache Einordnung von unbekanntem derivatisierten Verbindungen in bestimmte Verbindungskategorien nicht möglich.

Die entstandenen Chinoxaline und weitere Reaktionsprodukte werden durch Aufschlännen mit Wasser aus den erhitzten Modellsystemen extrahiert; das Avicel wird abzentrifugiert. Aus der überstehenden Lösung wird ein entsprechendes Aliquot entnommen, gefriergetrocknet und der wasserfreie Rückstand mit Hydroxylammoniumchlorid (1 %, w/w) in Pyridin versetzt. Dabei werden die Oxime der vorhandenen, mitextrahierten Carbonylgruppen enthaltenden Verbindungen gebildet. Die Modelle enthalten Reste an Zuckern sowie möglicherweise Amadori-Verbindungen. Daher ist eine Überführung in die Oxime sinnvoll. In einem zweiten Schritt werden die Oxime, Chinoxaline sowie fast alle übrigen Verbindungen in die Trimethylsilylderivate (TMS-Ether) überführt. Für die Einführung einer Trimethylsilylgruppe gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Derivatisierungsreagenzien und Derivatisierungstechniken [Lit. 333]. Häufig wird eine Mischung aus N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) und Trimethylchlorsilan (TMCS) verwendet.

In den eigenen Untersuchungen wurde eine Mischung N,N-Trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA) und TMCS eingesetzt, weil sich diese durch eine sehr hohe Silylierungskraft auszeichnet.

Ein geringer Überschuss an Silylierungsreagenz reicht bereits aus, um die Analyten vollständig zu silylieren. Auch geringe Mengen an Restfeuchtigkeit beeinträchtigen den Silylierungsvorgang nicht. Bei der Derivatisierung werden sämtliche Hydroxylgruppen der Kohlenhydra-



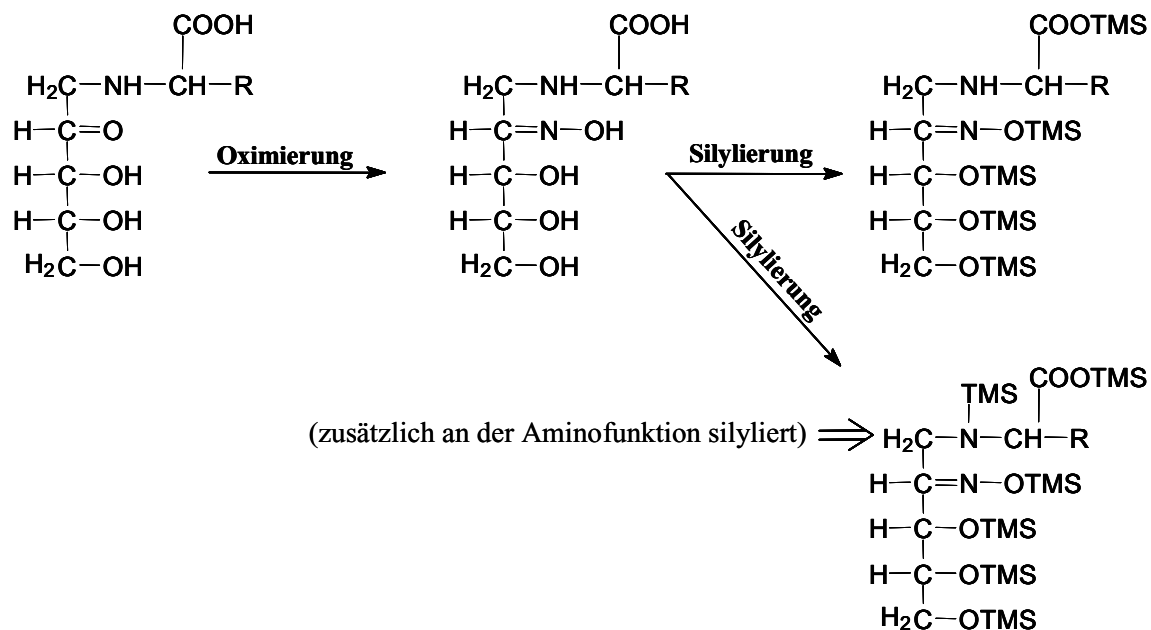
**Abbildung 3.14**

Gaschromatographische Trennung von oximierten und trimethylsilylierten Zuckern (Fructose, Glucose, Maltose), Amadori-Verbindungen (Fructose-Alanin) und trimethylsilylierten Hexose-Chinoxalinderivaten nebeneinander (1-DHQ, 3-DHQ = Chinoxalinderivate des 1- bzw. 3-Desoxyosons; aTBQ = Chinoxalinderivat des Glucosons), Abbildung Dissertation Liedke [Lit. 159]

te, der Amadori-Verbindungen und der aus den Dicarbonylverbindungen mit OPD gebildeten Chinoxaline umgesetzt. Bei der Verwendung von Hydroxylammoniumchlorid zur Oximierung von Carbonylverbindungen hat man eine zusätzliche Hydroxylgruppe in das Molekül eingeführt, die durch die Silylierung ebenfalls in einen TMS-Ether überführt wird, wie aus Abbildung 3.15 hervorgeht.

Bei der an die Silylierung sich anschließenden gaschromatographischen Trennung ergeben sich für die Aldosen und Ketosen nur zwei Peaks pro Verbindung, die von der *syn*- und *anti*-Form des Oxims stammen. Dabei stellt der erste Peak im Chromatogramm die *syn*- und der zweite die *anti*-Form dar. Aus sterischen Gründen findet man bei der Analyse von Aldosen bevorzugt die *syn*-Form. Bei Ketosen kann man keine ausgeprägte Präferenz für eine der beiden räumlichen Anordnungen finden [Lit. 62, 220]. Ohne eine Oximierung hätte man je nach Kohlenhydrat bis zu fünf isomere Formen (offene Form, Pyranose bzw. Furanose in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Form), die dann auch fünf Peaks im Chromatogramm ergeben können. Eine Mi-

schung verschiedener Kohlenhydrate wäre daher kaum auswertbar. Chinoxaline bleiben vom Schritt der Oximierung unberührt.



**Abbildung 3.15**

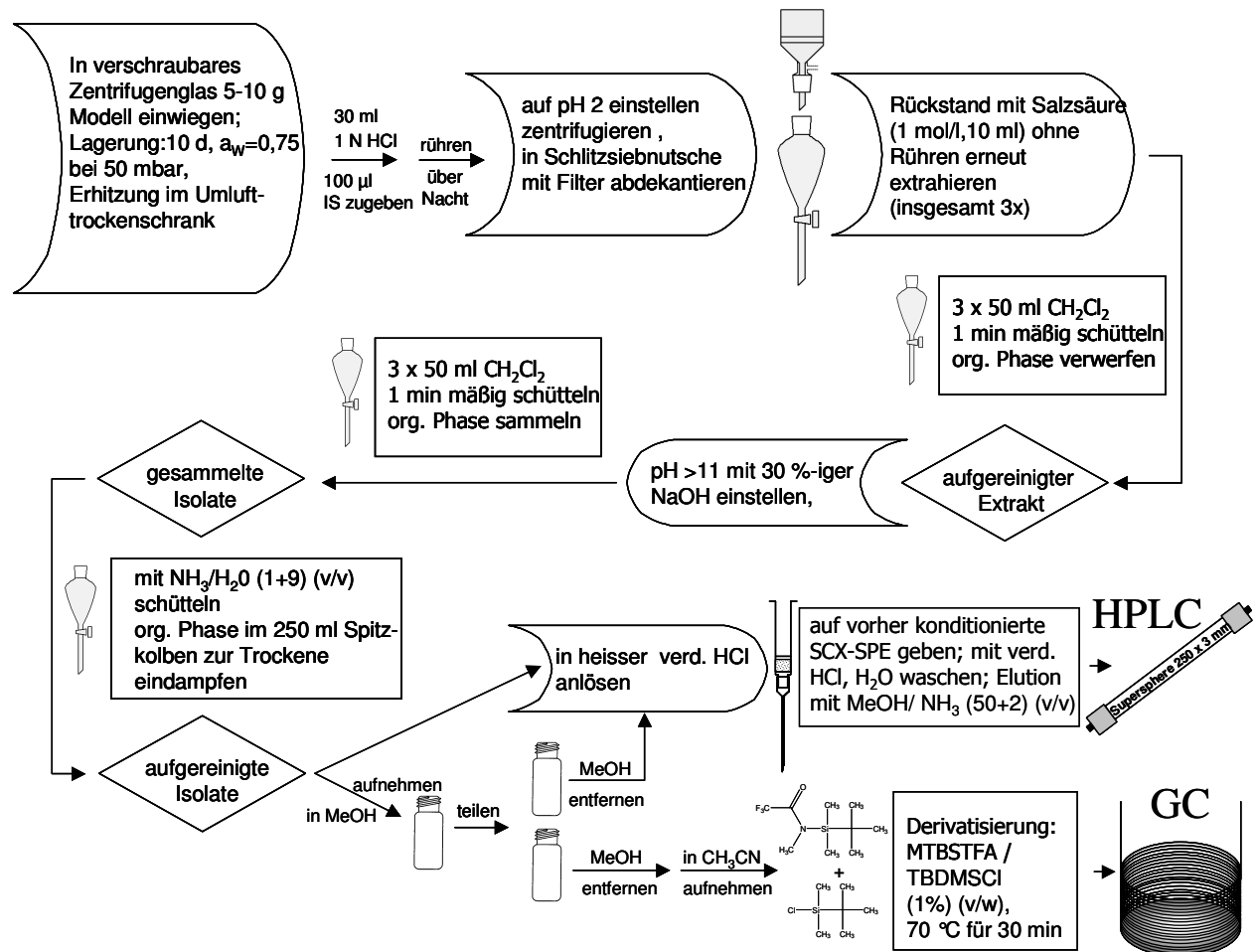
Oximierung und Silylierung von Pentose-Amadori-Verbindungen mit Hydroxylammoniumchlorid / MSTFA-TMCS (TMS- = Trimethylsilyl-)

Analog zum Hydroxylamin kann man O-Methylhydroxylamin als Oximierungsreagenz einsetzen. Man erhält dann O-Methyloxime. Bei diesen Derivaten zeigte sich in den eigenen Arbeiten eindeutig eine schlechtere Auftrennung der entsprechenden *syn*- und *anti*- Formen. Wittmann [Lit. 314] macht hierfür die fehlenden TMS-Ethergruppen an der Oximseitenkette verantwortlich. Neben den Hydroxylgruppen können auch im Molekül vorkommende Aminogruppen silyliert werden (N-TMS-Derivat). An der Aminofunktion wird dann zusätzlich eine Trimethylsilylgruppe eingeführt. Diese Silylierung tritt aber in untergeordnetem Maße auf. Takeoka et al. [Lit. 282] deuteten dies bei Amadori- und Heyns-Verbindungen als Hinweis auf eine sterische Hinderung der Silylierung an der Aminogruppe durch den TMS-Ether an der Oximseitenkette. Diese sterische Hinderung ist bei O-Methyloximen weniger stark ausgeprägt.

### 3.4.3 Reinigung, Isolierung und Analytik der in den Modellsystemen gebildeten HAAs

Die Aufarbeitung und Bestimmung der in den Modellsystemen gebildeten HAAs ist in Abbildung 3.16 schematisch aufgeführt (vgl. auch Kapitel 2.2). Jeweils etwa 2 - 10 g der nach den Vorschriften des Kapitels 6.7.1 hergestellten und bei verschiedenen Temperaturen unter-

schiedlich lange erhitzt, in der Regel reduzierende Zucker, Aminosäure und Kreatinin enthaltene Modellsysteme werden mit einer definierten Menge des inneren Standards 4,7,8-TriMeIQx versetzt und mit 1 molarer Salzsäure unter kräftigem Rühren (12 h, RT) extrahiert (siehe Kapitel 6.7.2).



**Abbildung 3.16**

Fließschema der durchgeführten Extraktions-, Isolierungs- und Aufreinigungsschritte mit anschließender Bestimmung der gebildeten HAAs mittels HPLC bzw. GC

Die durch Zentrifugation und Filtration (vgl. Kapitel 6.7.3) gewonnenen Extrakte werden durch Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan bei  $\text{pH} < 2$  aufgereinigt und die in der wässrigen Phase enthaltenen HAAs in einer weiteren nachfolgenden Verteilung mit Dichlormethan bei  $\text{pH} > 12$  isoliert (vgl. Kapitel 6.7.4). Die in der Dichlormethanphase gesammelten Isolate werden durch Ausschütteln mit wässriger Ammoniak-Lösung gereinigt. Nach Entfernen des Dichlormethans am Rotationsverdampfer bis zur Trockene wird der Rückstand in einer definierten Menge Methanol aufgenommen und die Lösungen werden entsprechend geteilt. Das Methanol wird im Stickstoffstrom bei 50 °C abgeblasen (vgl. Kapitel 6.2.3) und ein aliquoter Teil des Rückstandes direkt nach Silylierung (vgl. Kapitel 6.9.6) zur GC/MS



zwecks Trennung und quantitativem Nachweis der gebildeten HAAs als tert.-Butyldimethylsilylderivate eingesetzt.

Ein anderer Teil wird der HPLC-DAD (vgl. Kapitel 6.8.1.5) und der HPLC-MS/MS (vgl. Kapitel 6.8.2.2) zugeführt. Vor einer HPLC-Trennung muss jedoch noch eine weitere Aufreinigung der Isolate an einem stark sauren Kationenaustauscher (Benzylpropylsulfonsäure-Kartusche, SCX-SPE) erfolgen (vgl. Kapitel 6.7.5). Falls der Rückstand aus der zweiten Flüssig-Flüssig-Verteilung nicht geteilt werden soll, kann dieser direkt an der SCX-SPE-Kartusche gereinigt werden. Die quantitative Bestimmung der nachgewiesenen HAAs erfolgt über den inneren Standard 4,7,8-TriMeIQx nach Kapitel 6.8.1.4 und Kapitel 6.8.1.5.

Zur besseren Interpretation der in den Modellsystemen bestimmten Mengen an HAAs werden diese in ng pro mmol Kreatinin angegeben. Dies ist deswegen sinnvoll, weil – wie bereits häufiger erwähnt – das Kreatinin in Lebensmitteln und Modellsystemen des Maillard-Typs der wichtigste Reaktionspartner für die Bildung der HAAs ist.

### **3.5 Charakterisierung der Reaktionswege bei der Erhitzung einfacher, Kreatinin, Aminosäuren und Pentose enthaltender Modellansätze**

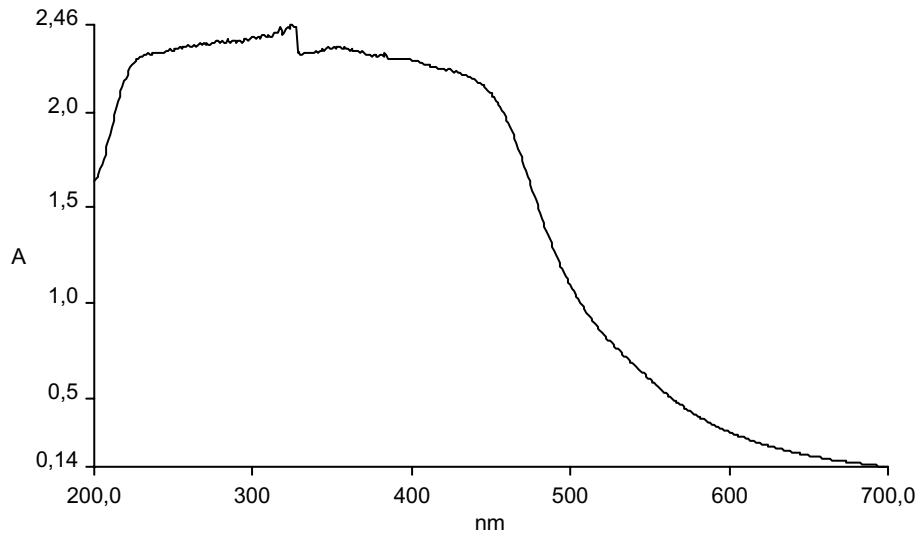
#### **3.5.1 Bräunungsverhalten**

Über das Bräunungsverhalten lassen sich zwar keine komplexen Reaktionen erklären, aber dennoch kann über den Bräunungsstatus viel darüber ausgesagt werden, in welcher Phase der Maillard-Reaktion man sich befindet.

Parallel zu den Xylose-Bräunungsmodellen wurden auch Glucose enthaltende Modelle analoger Zusammensetzung untersucht. Bei der Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Xylose-Modellsysteme liegt besonderes Augenmerk auf Zwischenprodukten, die in der frühen Phase der Maillard-Reaktion gebildet werden. Diese sind so reaktionsfähig, dass sie rasch zu Bräunungsprodukten weiterreagieren. Man kann davon ausgehen, dass diese reaktiven Zwischenstufen der Maillard-Reaktion – entsprechend des postulierten, über solche Zwischenstufen laufenden Bildungswegs von HAA – rasch zu HAAs weiterreagieren.

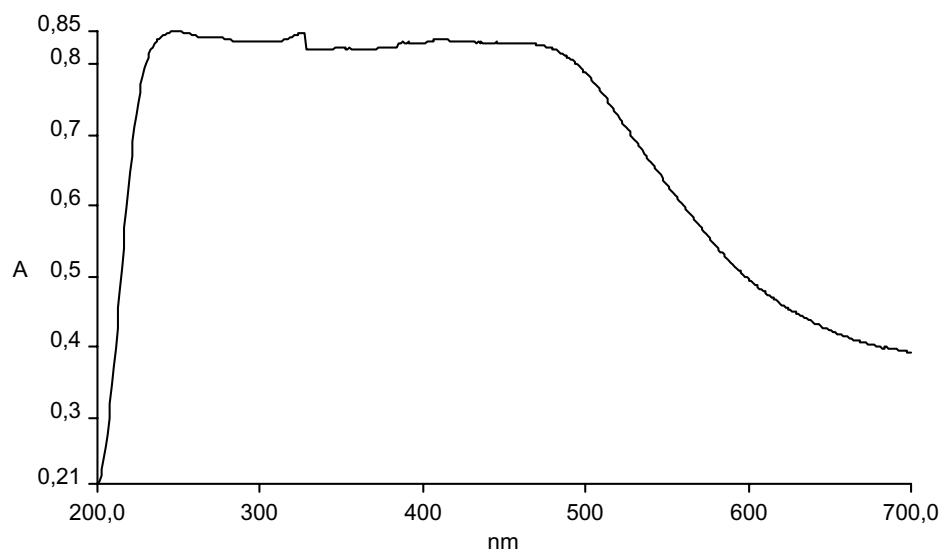
In Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18 kann man aus zwei exemplarischen UV-VIS-Spektren (Messparameter konstant gehalten) wässriger Extrakte von Xylose-Aminosäure (-Kreatinin)-Modellen auf Avicel-Basis, jeweils von gleicher molarer Zusammensetzung, nach jeweils 13 Tagen Lagerung bei einer Gleichgewichtsfeuchtigkeit von 75 % ( $a_w = 0,75$ ) bei Raumtemperatur, die Bräunungscharakteristik in Abhängigkeit von der Wellenlänge erkennen. Sie ist über den gesamten Aufnahmebereich zwar unspezifisch, jedoch erkennt man

bei einem Zusatz von Kreatinin an dem insgesamt höheren Absorptionsgrad eine deutlich stärkere Bräunung. Insbesondere ist im roten Bereich des Spektrums (550 - 700 nm) bei dem kreatininhaltigen Modell eine höhere Absorption feststellbar. Es ist zu vermuten, dass Kreatinin aufgrund seiner Guanidinstruktur mit vielen intermediär gebildeten Carbonylen Kondensationsreaktionen zu Bräunungsprodukten eingehen kann.



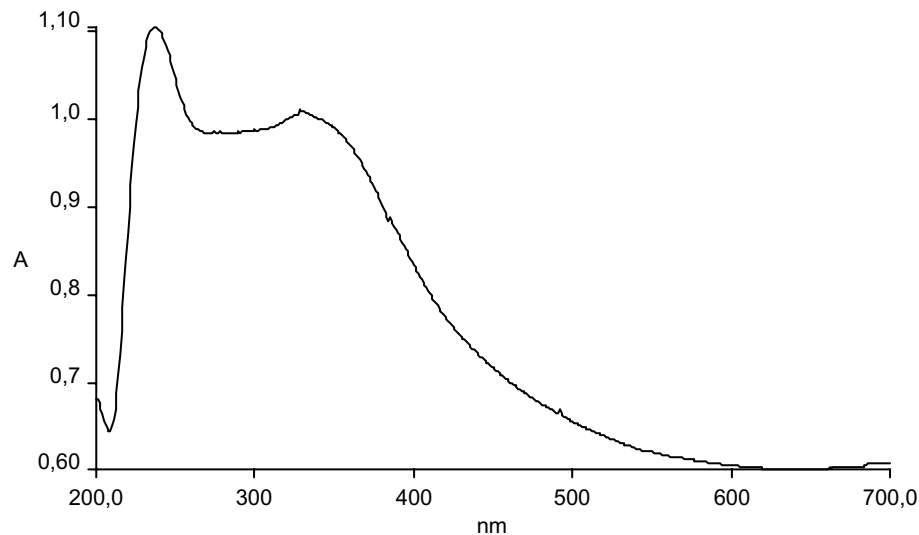
**Abbildung 3.17** Ermittlung der Bräunungscharakteristik eines Xylose/Glycin-Modelles anhand des Absorptionsverhaltens

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, unverdünnt eingesetzt  
 Komponenten: Xylose, Glycin  
 (molares Verhältnis 0,5:1, Matrix 7,5 g Avicel je g Xylose)  
 Lagerung des Modells: 13 d bei a<sub>w</sub> = 0,75, RT  
 Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglaszuvetten  
 Wellenlänge: Scanbereich von 200 bis 700 nm; Lampe: Wolfram (Vis) und Deuterium (UV)



**Abbildung 3.18** Ermittlung der Bräunungscharakteristik eines Xylose/Glycin/Kreatinin-Modelles anhand des Absorptionsverhaltens

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, nach Verdünnung (1:2) eingesetzt  
 Komponenten: Xylose, Glycin, Kreatinin  
 (molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 7,5 g Avicel je g Xylose)  
 Lagerung des Modells: 13 d bei a<sub>w</sub> = 0,75, RT  
 Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglaszuvetten  
 Wellenlänge: Scanbereich von 200 bis 700 nm; Lampe: Wolfram (Vis) und Deuterium (UV)



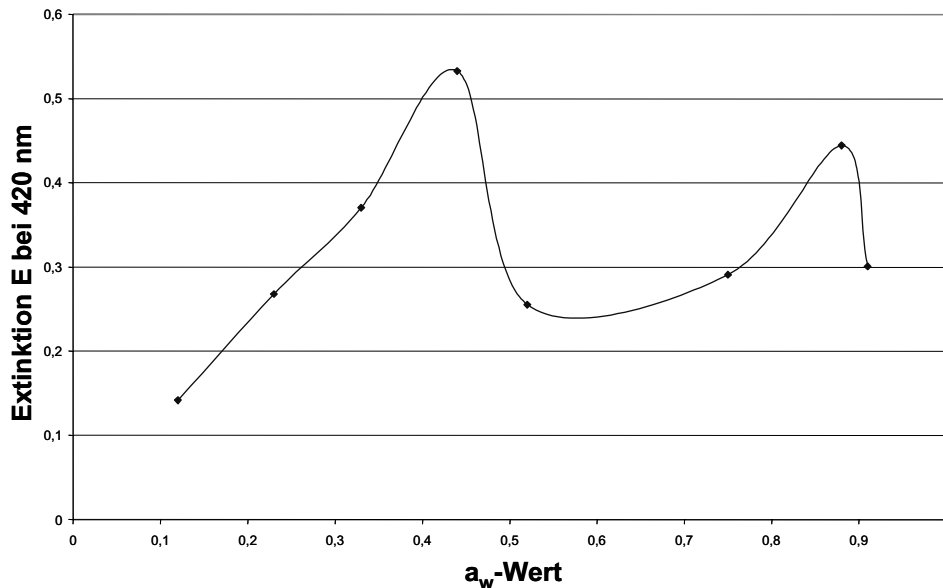
**Abbildung 3.19** Ermittlung der Bräunungscharakteristik eines Xylose/Alanin/Kreatinin-Modells anhand des Absorptionsverhaltens

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, unverdünnt eingesetzt  
 Komponenten: Xylose, Alanin, Kreatinin  
 (molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 7,5 g Avicel je g Xylose)  
 Lagerung des Modells: 13 d bei  $a_w = 0,75$ , RT  
 Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglaszuvetten  
 Wellenlänge: Scanbereich von 200 bis 700 nm; Lampe: Wolfram (Vis) und Deuterium (UV)

Betrachtet man das parallel untersuchte Avicel-Modellsystem mit den Reaktionsprodukten Xylose, Alanin und Kreatinin (vgl. Abb. 3.19), so zeigt sich hier zum einen ein geringerer Bräunungsgrad, zum anderen ist die beschriebene markante Absorption von Xylose-Glycin-Kreatinin-Modellsystemen im roten Bereich nicht zu erkennen. Die Bräunung ist in dem Alanin enthaltenden Modell besser strukturiert als bei den entsprechenden, Glycin enthaltenden Avicel-Modellsystemen. So treten klar erkennbare Absorptionsmaxima bei  $\lambda = 230$  und  $\lambda = 325$  nm auf. Eine genaue Zuordnung, welche Bräunungsprodukte diese Absorptionsmaxima zeigen, ist nicht möglich.

Die Bedeutung des  $a_w$ -Wertes für die stattfindende Maillard-Reaktion der in dieser Arbeit untersuchten Modellsysteme beschreibt Abbildung 3.20. Trägt man den  $a_w$ -Wert gegen die bei  $\lambda = 420$  nm gemessene Extinktion des entsprechenden wässrigen Extraktes der 10 Tage bei Raumtemperatur gelagerten Xylose-Glycin-Kreatinin-Modellmischung auf, so lassen sich bei  $a_w = 0,44$  und  $a_w = 0,88$  deutlich zwei ausgeprägte Maxima der Absorption erkennen, obwohl erfahrungsgemäß bei wasserarmen Systemen eigentlich nur ein einziges Maximum der durch die Maillard-Reaktion verursachten Bräunung etwa bei  $a_w = 0,75$  zu erwarten ist. Um in den Messbereich des Photometers bei Vermessung von Probelösungen länger gelagerter Modellsysteme zu bleiben, müssen die wässrigen Extrakte der beschriebenen Kreatinin-haltigen Modellsysteme (Messreihe 1) mehrfach verdünnt werden. Um diesen Verdünnungsschritt zu

vermeiden, wurden weitere Messreihen mit geringeren Konzentrationen an Xylose, Aminosäurekomponente und Kreatinin pro g Avicel durchgeführt (Messreihe 2).



**Abbildung 3.20/Messreihe 1:**

Abhängigkeit der Bräunung eines Xylose/Glycin/Kreatinin-Modells auf Avicel-Basis vom  $a_w$ -Wert

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, (1:10 verdünnt)

Komponenten: Xylose, Glycin, Kreatinin  
(molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 7,5 g Avicel je g Xylose)

Lagerung des Modells: 10 d bei verschiedenen  $a_w$ -Werten, RT

Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglasküvetten

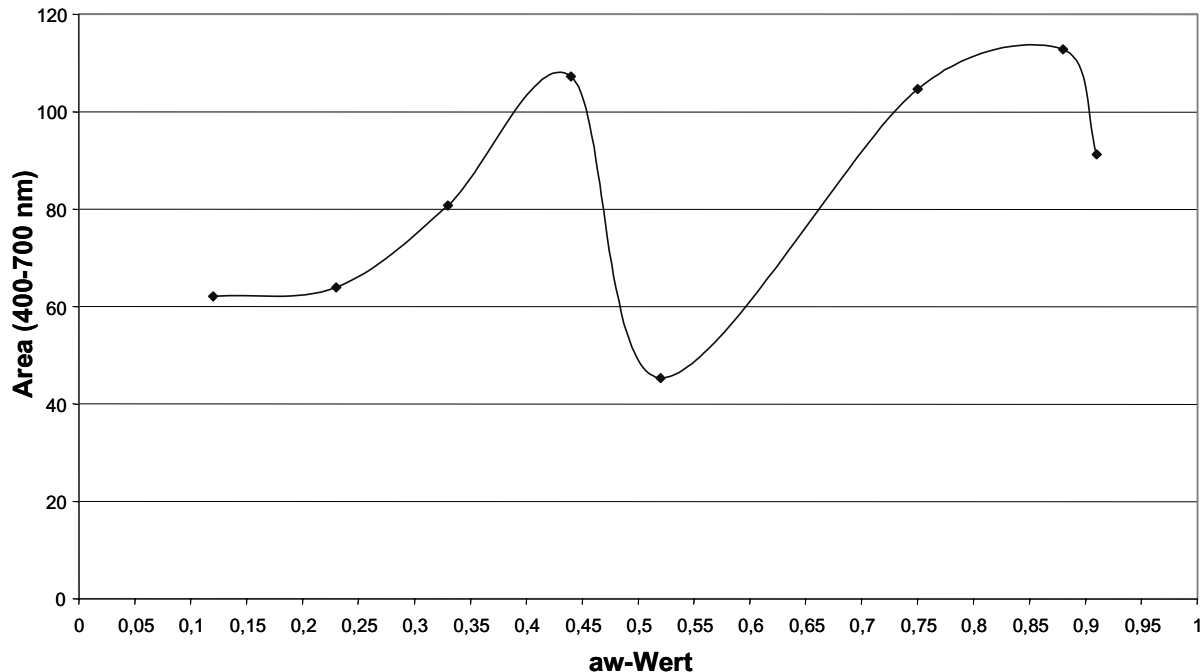
Wellenlänge: 420 nm;

Lampe: Wolfram

Um sicherzustellen, dass die gemessene Bräunungsintensität nicht nur von einigen wenigen Folgeprodukten der Maillard-Reaktion beeinflusst wird, die gerade bei der Messwellenlänge  $\lambda = 420$  nm eine starke Absorption zeigen, ist, wie in Abbildung 3.21 zu sehen, ein anderer Auswertemodus gewählt worden. Da die kompletten Messreihen mit einem selbstregistrierenden Photometer (vgl. Kapitel 6.10.1) durchgeführt wurden, sind für jeden Messpunkt der Messreihe über das gesamte aufgenommene Spektrum die jeweiligen Extinktionswerte verfügbar. Mittels geeigneter Datenauswertung kann dann für jeden Messpunkt die Aufsummierung der Extinktionen aller für die Bräunung relevanten Messwellenlängen erfolgen.

In der vorliegenden Auswertung sind daher die Integrale der Extinktionen von 400 nm bis 700 nm gewählt worden. Die oben beschriebene Ausbildung zweier  $a_w$ -Wert-abhängiger Bräunungsmaxima kann ebenfalls beobachtet werden. Für eine einfache Betrachtung genügt jedoch die Absorption bei  $\lambda = 420$  nm, wie in Abbildung 3.20 dargestellt. Es ist ein Zusammenhang der Bräunungstendenz bei Raumtemperatur (Maillard-Gesamtreaktion) und der HAA-Bildung, die durch zahlreiche Reaktionsprodukte der Maillard-Reaktion, wie die eigenen Arbeiten zeigen konnten (vgl. Kapitel 3.6 ff), beeinflusst wird, zu vermuten. Die Bildungstendenz bräunungsaktiver Vorstufen im Rahmen der Maillard-Reaktion während der

Lagerung von Xylose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Avicel-Modellsystemen bei Raumtemperatur kann daher Rückschlüsse auf die während der Erhitzung ähnlich zusammengesetzter Modellsysteme gebildeter Vorstufen der heterocyclischen aromatischen Amine (HAAs) geben.



**Abbildung 3.21/Messreihe 1**

Abhängigkeit der Bräunung eines Xylose/Glycin/Kreatinin-Modells auf Avicel-Basis vom  $a_w$ -Wert nach jeweils

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, (1:10 verdünnt)

Komponenten: Xylose, Glycin, Kreatinin  
(molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 7,5 g Avicel je g Xylose)

Lagerung des Modells: 10 d bei verschiedenen  $a_w$ -Werten, RT

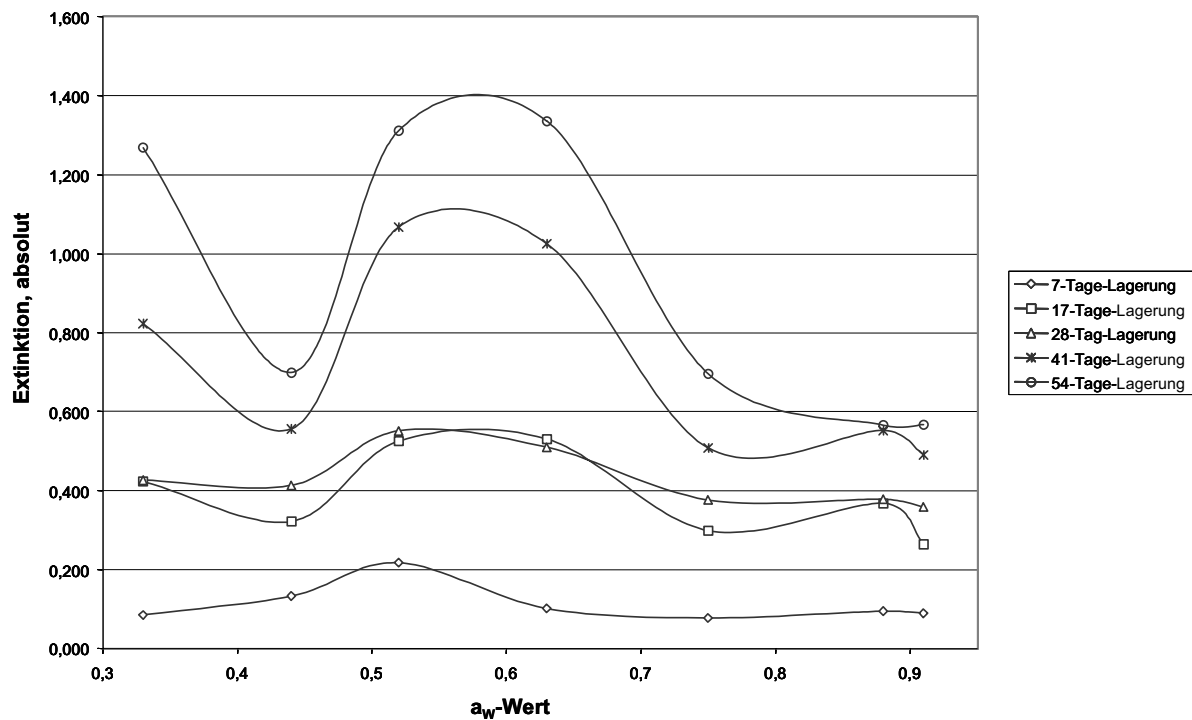
Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglas-Küvetten

Wellenlänge: Scanbereich 400-700 nm, Auswertung über das Integral der Extinktionen von 400-700 nm (Origin 8.0)

Lampe: Wolfram

In seinen Arbeiten beschreibt Goldbeck [Lit. 69] in auf 120 °C für 6 h erhitzten Xylose-Glycin-Kreatin-Modellsystemen auf Avicelbasis ein wassergehaltsabhängiges Optimum der HAA-Bildung zwischen  $a_w = 0,75$  und  $a_w = 0,88$  (wie bei der Bräunung). Die größere Reaktivität bei höheren Wassergehalten ist vermutlich auf den erleichterten Transport der wasserlöslichen Reaktanden zurückzuführen.

In den eigenen Arbeiten zeigt sich je nach Modellzusammensetzungen in Messreihe 2 für das Xylose-Glycin-Modell (Abb. 3.22), für das Xylose-Glycin-Kreatinin-Modell (Abb. 3.23) und für das Xylose-Alanin-Kreatinin-Modell (Abb. 3.24) jeweils eine verschiedene, von dem während der Lagerung gewählten  $a_w$ -Wert und der Lagerungsdauer abhängige Bräunungscharakteristik. Zunächst kann man aus diesen Erkenntnissen nur bedingt Voraussagen bezüglich der Bildung von HAAs in ähnlich zusammengesetzten Modellsystemen nach Erhitzung dieser Modellsysteme treffen.



**Abbildung 3.22/Messreihe 2**

Abhängigkeit der Bräunung eines Xylose/Glycin-Modells auf Avicel-Basis vom  $a_w$ -Wert und der Lagerungsdauer

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, nach Verdünnung (1:5) eingesetzt

Komponenten: Xylose, Glycin  
(molares Verhältnis 0,5:1, Matrix 10 g Avicel je g Xylose)

Lagerung des Modells: Dauer der Lagerung variabel, Lagerung unter bestimmten  $a_w$ -Werten

Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglasküvetten

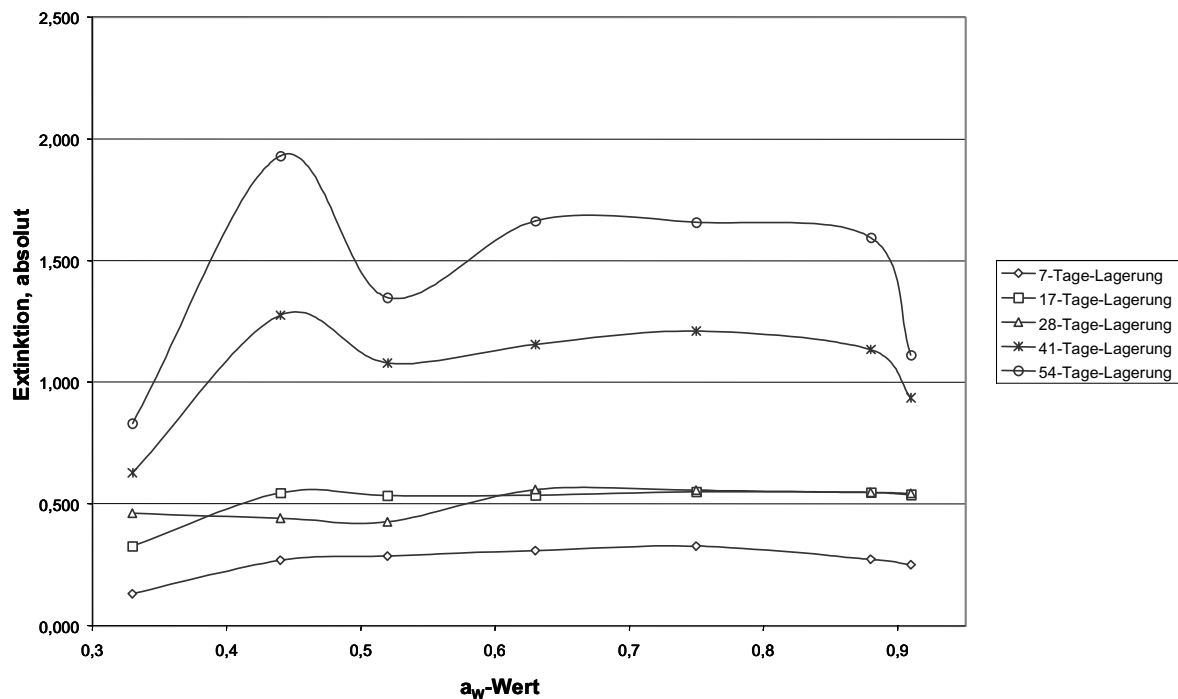
Wellenlänge: 420 nm

Lampe: Wolfram

Beim Xylose-Glycin-Kreatinin-Modell (Abb. 3.23) fällt auf, dass sich nach längerer Lagerung klar ein Maximum der Bräunung zwischen den beiden Messpunkten  $a_w = 0,52$  und  $a_w = 0,63$  bildet. Bei  $a_w = 0,33$  sind nach längerer Lagerung relativ hohe Bräunungswerte zu beobachten.

Bei dem Xylose-Glycin-Kreatinin-Modell (Abb. 3.23) ist die Bräunungsintensität, verglichen mit den übrigen Modellen dieser Messreihe, bereits nach sieben Tagen Lagerung relativ hoch. Die beschriebenen Beobachtungen an qualitativ analog zusammengesetzten Modellen der ersten Messreihe sind erst nach längerer Lagerung zu beobachten. Zunächst beobachtet man über den gesamten gewählten  $a_w$ -Wert-Bereich einen weitgehend gleichmäßigen Bräunungsverlauf. Nach 44 Tagen und noch ausgeprägter nach 54 Tagen Lagerung haben sich ein Maximum der Bräunung bei  $a_w = 0,44$  und ein Plateau hoher Bräunungsintensität in einem  $a_w$ -Wert-Bereich von 0,63 bis 0,88 ausgebildet. In dem Modell der Messreihe 1 (Abb. 3.21) bil-

den sich jedoch schon nach 13 Tagen Lagerung zwei klare Maxima aus. Der Verlauf der Bräunung ist zwar unspezifisch, da viele nicht weiter erfassbare Bräunungsprodukte entstehen können, aber es gibt durchaus eine erkennbare Abstufung während des Bräunungsprozesses. Unter bestimmten Bedingungen kann die Reaktion zu weiteren reaktiven, bräunungsaktiven Zwischenstufen, die aus primär gebildeten Reaktionsprodukten entstehen, zu einer merklichen Steigerung der Bräunungsintensität führen. Die Bildung der primären Reaktionsprodukte ist sowohl von der Konzentration der Edukte als auch von der Lagerungsdauer abhängig. In Messreihe 1 findet daher aufgrund der höheren Konzentration an Xylose, Glycin und Kreatinin pro g Avicel die Reaktion zu Folgeprodukten bei entsprechenden  $a_w$ -Werten bereits nach wenigen Tagen statt. Die Maxima der Bräunungsintensität könnten demnach eine vermehrte Bildung von bezüglich der HAA-Bildung reaktiven und bräunungsaktiven Folgeprodukten anzeigen.



**Abbildung 3.23/Messreihe 2**

Abhängigkeit der Bräunung eines Xylose/Glycin/Kreatinin-Modells auf Avicel-Basis vom  $a_w$ -Wert und von der Lagerungsdauer

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, nach Verdünnung (1:5) eingesetzt

Hauptkomponenten: Xylose, Glycin, Kreatinin  
(molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 10 g Avicel je g Xylose)

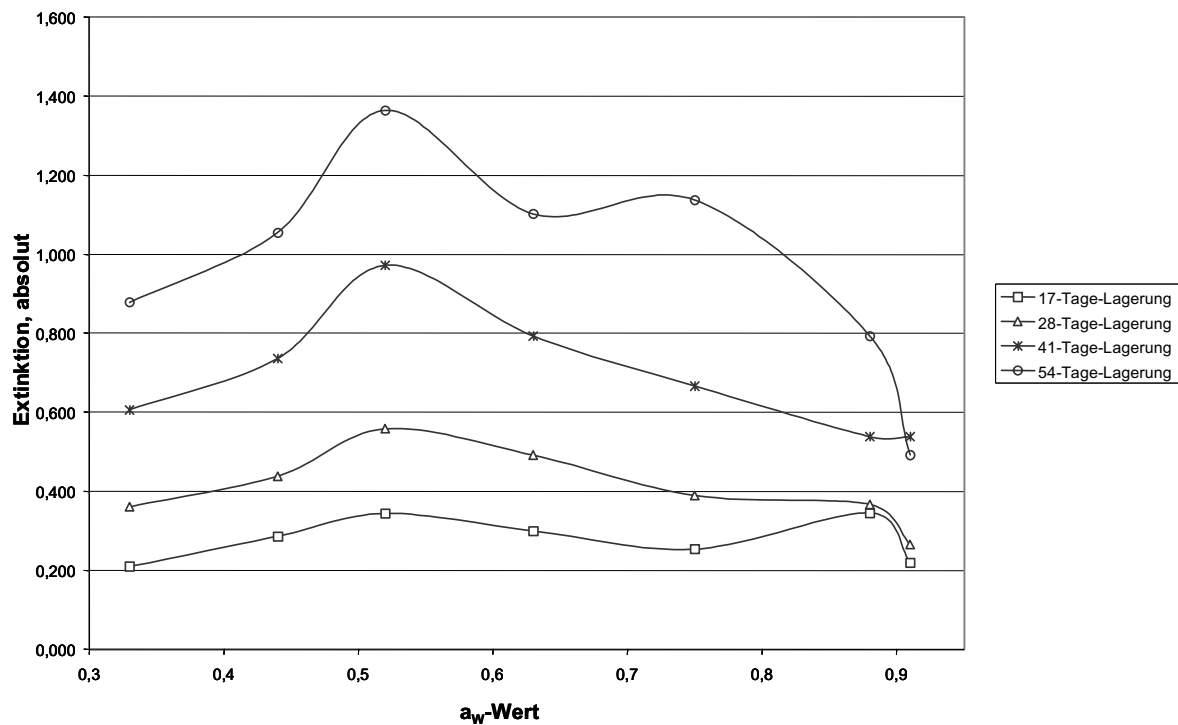
Lagerung des Modells: Dauer der Lagerung variabel, Lagerung unter bestimmten  $a_w$ -Werten

Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglas-Küvetten

Wellenlänge: 420 nm

Lampe: Wolfram

Bei dem Xylose-Alanin-Kreatinin-Modell (Abb. 3.24) zeigt sich ein bezüglich der Ausbildung des Maximums der Bräunungsintensität und der Intensität der Bräunung bei gleicher Lagerungsdauer ähnlicher Verlauf wie bei Xylose-Glycin-Modellsystemen.



**Abbildung 3.24/Messreihe 2**

Abhängigkeit der Bräunung eines Xylose/Alanin/Kreatinin-Modells auf Avicel-Basis vom  $a_w$ -Wert und der Lagerungsdauer

Probenextrakt: 100 mg mit 2 ml H<sub>2</sub>O extrahiert, (1:1 verdünnt)

Hauptkomponenten: Xylose, Alanin, Kreatinin  
(molares Verhältnis 0,5:1:1, Matrix 10 g Avicel je g Xylose)

Lagerung des Modells: Dauer der Lagerung variabel, Lagerung unter bestimmten  $a_w$ -Werten

Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer), 1 cm Quarzglas-Küvetten

Wellenlänge: 420 nm

Lampe: Wolfram

Aus der Charakteristik des Bräunungsverhaltens der untersuchten Modellsysteme ergibt sich zusammenfassend, dass Kreatinin in den beschriebenen Reaktionsmischungen sowohl die Bräunungscharakteristik als auch den Bräunungsverlauf beeinflusst, da sich die Bräunungscharakteristik Kreatinin-haltiger Modellsysteme deutlich von der Kreatinin-freier Modellsysteme unterscheidet. Modellsysteme, die Alanin enthalten, zeigen zwar eine ähnliche Bräunungscharakteristik in Abhängigkeit von der eingestellten Gleichgewichtsfeuchtigkeit und der Lagerungsdauer. Jedoch sind speziell bei einer längeren Lagerung des Alanin enthaltenden Modellsystems durchweg niedrigere Bräunungsintensitäten zu beobachten.

Inwieweit Kreatinin mit Reaktionsprodukten aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion zu bräunungsaktiven Folgeprodukten reagiert, ist aus den durchgeführten Bräunungsversuchen nicht zu erkennen. Daher ist es sinnvoll, die frühe Phase der Maillard-Reaktion, also noch vor der Bildung primärer Bräunungsprodukte, von Pentosen und Aminosäuren unter Zusatz von Kreatinin näher zu analysieren. Die im Folgenden beschriebenen Trapping-Ansätze mit ortho-Phenylendiamin können näheren Aufschluss darüber geben, inwieweit Kreatinin Reaktionsprozesse in der frühen Phase der Maillard-Reaktion beeinflussen kann.



### 3.5.2 Erkenntnisse aus dem Einsatz von ortho-Phenylendiamin als Trapping-Reagenz („Eintopfreaktion“)

#### 3.5.2.1 Vorversuche

Vor dem Ansatz umfangreicher Modellreihen wurden einige wichtige Vorversuche mit neben Monosacchariden, Aminosäuren und Kreatinin noch OPD enthaltenden Modellsystemen durchgeführt. Bereits nach wenigen Tagen Lagerung bei  $a_w = 0,75$  ist bei einem Xylose, Glycin und Kreatinin enthaltenden OPD enthaltenden Modell eine intensive Braunfärbung bereits bei Raumtemperatur zu erkennen. Ein vergleichbar angesetztes glucosehaltiges Modell unter Zusatz von OPD zeigt kaum eine Bräunung.

Zur Optimierung der Extraktion wurden jeweils mehrere Xylose enthaltenden Modelle mit Zusatz von OPD, die sich lediglich durch unterschiedliche Lagerungsdauer bei Raumtemperatur unter  $a_w = 0,75$  unterschieden, wahlweise mit bidestilliertem Wasser, 1-Butanol, Essigsäureethylester und Ethanol extrahiert. Die mit den verschiedenen organischen Lösungsmitteln gewonnenen Extrakte waren jedoch hinsichtlich ihrer mengenmäßigen Zusammensetzung nicht reproduzierbar. Daher wurde auf eine Extraktion mit diesen Lösungsmitteln verzichtet, da z. B. bei der Extraktion mit 1-Butanol sich nach Oximierung und Silylierung des eingegangenen Extraktes (vgl. Kapitel 6.8.5.2) im Gaschromatogramm zahlreiche weitere Komponenten im Spurenbereich, deren Struktur nicht bestimmt werden konnte, auftraten. Eine Extraktion mit Methanol ist bezüglich Ausbeute und Zusammensetzung mit einer Extraktion mit bidest. Wasser zu vergleichen. Der Arbeitsaufwand, das Wasser durch Gefriertrocknung zu entfernen, ist jedoch geringer als der Aufwand, um Methanol im Vakuumverdampfer zu entfernen. Der Versuch, das in den untersuchten, Hexose bzw. Pentose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Avicel-Modellsystemen bereits bei der Herstellung zugesetzte Abfangreagenz OPD in gleicher Weise durch weitere aromatische Diaminoverbindungen wie 1,8-Diaminonaphthalin zu ersetzen, führte zu keinen brauchbaren Ergebnissen. In entsprechenden oximierten und silylierten Extrakten der entsprechenden Modellsysteme (Derivatisierung vgl. Kapitel 6.8.5.2) lassen sich neben dem eingesetzten Glycin und der Xylose weder per GC/MS noch per Nanospray-ESI-MS/MS weitere Verbindungen, die anhand ihrer aussagekräftigen Massenspektren identifiziert werden können, nachweisen.

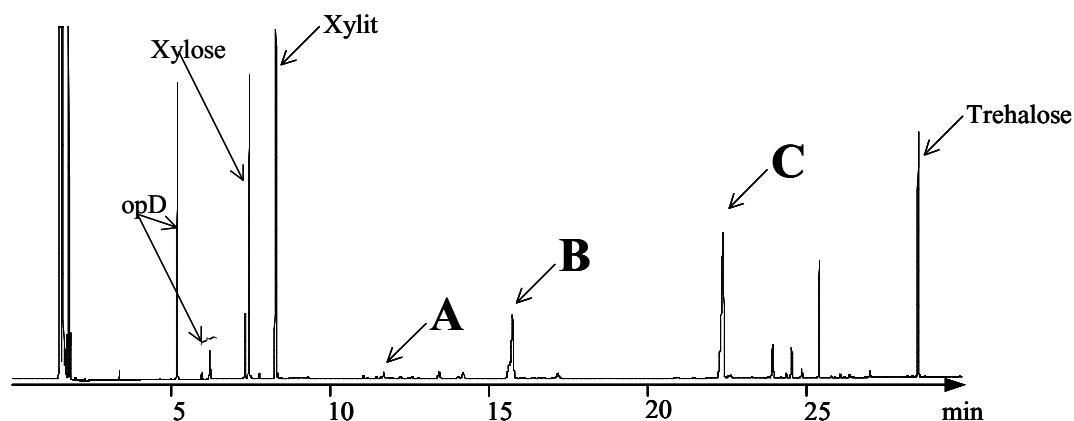
Die Konzentration von OPD in den Modellen beeinflusst die Menge der gebildeten Reaktionsprodukte nur geringfügig. Bereits bei einem molaren Verhältnis von Xylose zu OPD von 1:0,1 werden die später beschriebenen Hauptkomponenten gebildet. Die Ausbeute ist jedoch geringer. In bisherigen Arbeiten mit Modellsystemen [Lit. 99, 193] wurde ein 1- bis 5-facher

molarer Überschuss an OPD in Bezug auf Xylose eingesetzt. Eigene Untersuchungen mit 3-Desoxyglucoson bestätigten, dass bei einem einfach-molaren Überschuss an Abfangreagenz die optimale Ausbeute an Chinoxalinen gegeben ist. Bei einem Verhältnis von Glucoson zu OPD von 1:0,5 halbiert sich die Bildungsrate des aus dem Glucoson und OPD gebildeten Chinoxalins im Vergleich zu einem 1:1-Verhältnis. Für weitere Versuche wird, wenn nicht anders vermerkt, ein äquimolarer Zusatz von OPD in Bezug auf die jeweilige Pentose beige-mischt.

Im Anhang unter 8.9 findet sich ein Überblick über die gesamten unter Zusatz von OPD zu Avicel-Modellsystemem durchgeführten Experimente mit den jeweiligen variablen Parametern.

### 3.5.2.2 Qualitative Auswertung der Trapping-Versuche mit OPD

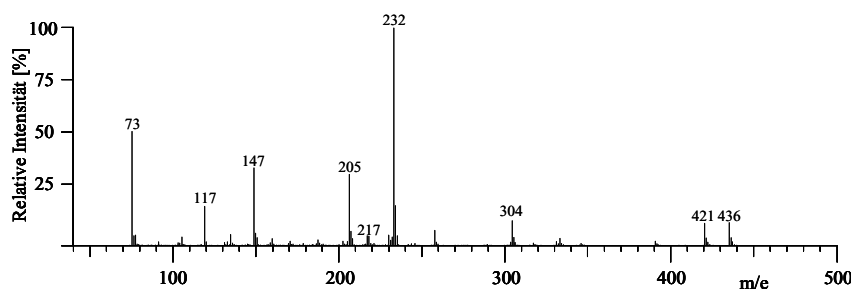
Bei allen in den eigenen Arbeiten untersuchten pentosehaltigen Modellsystemen mit OPD als Trapping-Reagenz entstehen primär drei nach Silylierung von entsprechenden Extrakten (vgl. Kapitel 6.8.5.2) gaschromatographisch und massenspektrometrisch nachweisbare Reaktionsprodukte, wie beispielhaft bei einem nur Xylose und OPD enthaltenden, unter  $a_w = 0,44$  für 10 Tage bei Raumtemperatur gelagerten wasserarmen Avicel-Modell in Abbildung 3.25 zu sehen ist. Wie die nachfolgenden Strukturuntersuchungen mit GC/MS zeigt, handelt es sich dabei um Addukte des OPD. Die Bildung dieser Reaktionsprodukte ist in allen in den eigenen Arbeiten untersuchten Modellsystemen nachweisbar, und zwar unabhängig von möglichen weiteren Zusätzen wie Aminosäuren und/oder Kreatinin.



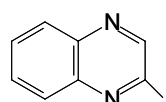
**Abbildung 3.25**

GC-FID-Chromatogramm eines wässrigen Extraktes aus einem wasserarmen, Xylose und OPD enthaltenden Avicel-Modellsystem (Xylose+OPD (1:1); Lagerung bei Raumtemperatur und  $a_w = 0,44$ , 10 Tage, RT). Erhitzung im Trockenschrank 30 min, 70 °C Lyophilisat oximiert und silyliert (Xylit, und Trehalose als innerer Standard). Identität der Verbindungen A, B und C siehe Abbildungen 3.26, 3.27 und 3.28

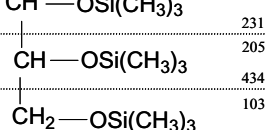
## Fragmentierungsmuster für Reaktionskomponente A:



## Strukturvorschlag für Reaktionskomponente A:



M=436



m/z	Fragment
73	TMS
117	TMS-O-CO
147	TMS-CH-O-CH <sub>2</sub>
217	TMS-CH=CH-CH-O-TMS

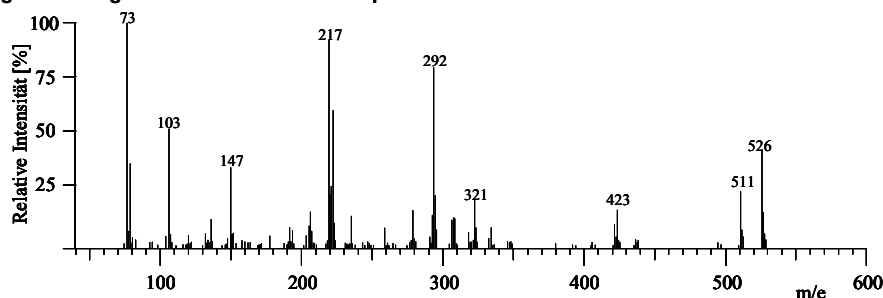
## Abbildung 3.26

Massenspektrum (oben) von nach Kapitel 6.8.5.3 silyliertem und gaschromatographisch getrenntem Chinoxalinderivat der 2-Xylosulose (Reaktionsprodukt A), GC-Trennung vgl. Abbildung 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1; Strukturvorschlag für Reaktionsprodukt A (unten)

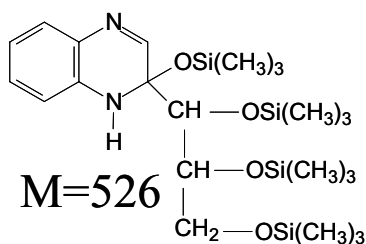
Das Reaktionsprodukt A konnte in weiteren Derivatisierungsansätzen nach entsprechender Acetylierung oder Methylierung der gewonnenen Extrakte als dreifach acetyliertes bzw. methyliertes Chinoxalinderivat der 2-Xylosulose identifiziert werden. Bei den beiden anderen Reaktionsprodukten (B, m/e = 526, vgl. Abb. 3.27; C, m/e = 598, vgl. Abb. 3.28) handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die jeweils unterschiedlich silylierte SCHIFF'sche Base (jeweils Strukturvorschlag 2) der 2-Xylosulose mit OPD. Jedoch ist nach dem Fragmentierungsmustern auch die jeweils unter Strukturvorschlag 1 dargestellte silylierte Verbindung denkbar. Eine sichere Strukturaufklärung ist trotz exakter Massenbestimmung über GC/TOF nicht möglich. Die Strukturaufklärung der entsprechenden Reaktionsprodukte B und C nach Acetylierung führte zu keiner weiteren Strukturabsicherung. Für Untersuchungen mittels NMR sind mindestens Substanzmengen von 2 mg erforderlich, die durch einfache Extraktion von Modellproben nicht zur Verfügung stehen. Daher müssten die Reaktionsprodukte B und C zunächst z. B. durch HPLC-DAD, wie in Kapitel 3.5.2.5 beschrieben, fraktioniert werden, um eine ausreichende Menge dieser Verbindungen in isolierter Form zu erhalten.

Neben den genannten Reaktionsprodukten werden noch zahlreiche weitere Reaktionsprodukte in unterschiedlichen Mengen gebildet. Strukturuntersuchungen mit GC-MS führen zu keinem klaren Ergebnis, da die entsprechenden Fragmentierungen zu wenig aussagekräftig sind. Wenn die Nebenkomponten näher untersucht werden sollen, ist es hilfreich, sich der HPLC/ESI-MS/MS zu bedienen, um zunächst das Molgewicht der underivatisierten Verbindungen zu bestimmen.

## Fragmentierungsmuster für Reaktionskomponente B:

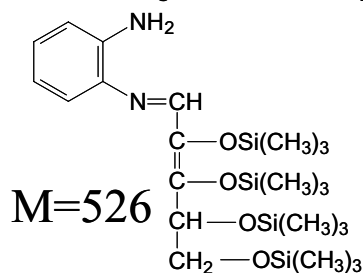


## Strukturvorschlag 1 für Reaktionskomponente B:



m/z	Fragment
73	TMS
103	TMS-CH <sub>2</sub>
117	TMS-O-CO
147	TMS-CH-O-CH <sub>2</sub>
205	TMS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH-O-TMS
217	TMS-CH=CH-CH-O-TMS
218	TMS-CH=CH-CH <sub>2</sub> -O-TMS

## Strukturvorschlag 2 für Reaktionskomponente B:

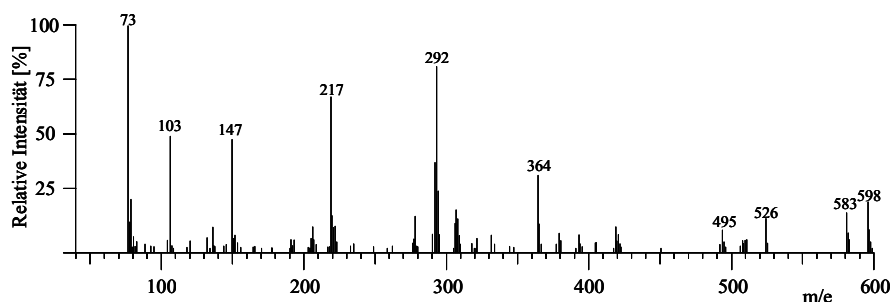


## Abbildung 3.27

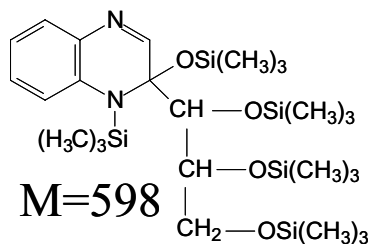
Massenspektrum (oben) von nach Kapitel 6.8.5.3 silylierter und gaschromatographisch getrennter Reaktionsprodukt B, GC-Trennung vgl. Abbildung 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1; Strukturvorschläge für Reaktionsprodukt B (unten)

Das bereits in Abbildung 3.25 gezeigte GC-Chromatogramm einer Versuchsreihe, bei der im Avicel-Modellsystem lediglich Xylose und OPD in äquimolaren Mengen vorhanden waren, ist in Verbindung mit dem Gaschromatogramm eines weiteren Erhitzungsversuches in Abbildung 3.29 dargestellt. In dieser Versuchsreihe wurden jeweils aliquote Anteile der Modellmischung eine Woche bei Wasseraktivitäten von  $a_w = 0,44$  bis  $a_w = 0,75$  gelagert und anschließend bei 70 ° bzw. 140 °C erhitzt. Die Abbildung zeigt deutlich, dass sich die beiden Teilerperimente hinsichtlich der entstandenen Reaktionsprodukte qualitativ und quantitativ unterscheiden. Bei einer Gleichgewichtsfeuchtigkeit während der Lagerung von  $a_w = 0,44$  und einer anschließenden Erhitzung der Probe von 70 °C für 30 min lassen sich nach Oximierung und Silylierung der entsprechenden Extrakte noch deutliche Mengen an freiem noch nicht umgesetztem OPD nachweisen.

## Fragmentierungsmuster für Reaktionsprodukt C:

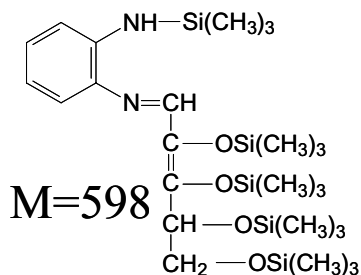


## Strukturvorschlag 1 für Reaktionsprodukt C:



m/z	Fragment
73	TMS
103	TMS-CH <sub>2</sub>
117	TMS-O-CO
147	TMS-CH-O-CH <sub>2</sub>
205	TMS-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH-O-TMS
217	TMS-CH=CH-CH-O-TMS
218	TMS-CH=CH-CH <sub>2</sub> -O-TMS

## Strukturvorschlag 2 für Reaktionsprodukt C:



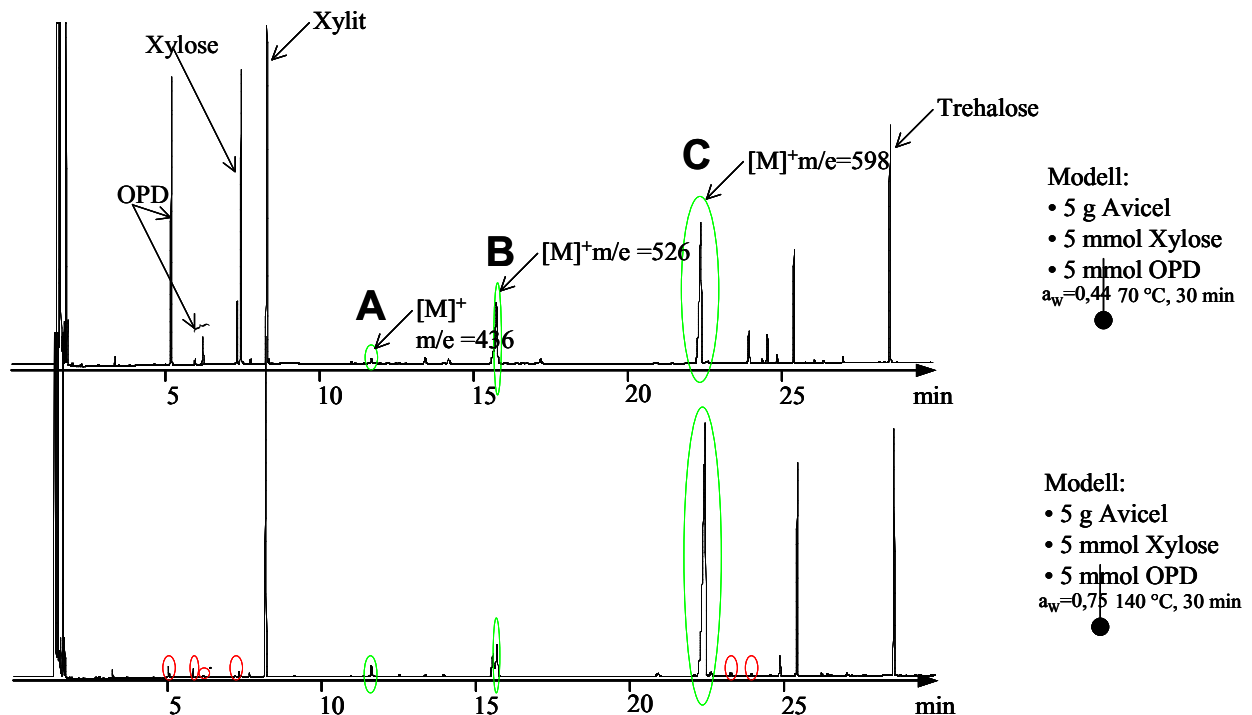
## Abbildung 3.28

Massenspektrum (oben) von nach Kapitel 6.8.5.3 silylierter und gaschromatographisch getrennter Reaktionsprodukt C, GC-Trennung vgl. Abbildung 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1; Strukturvorschläge für Reaktionsprodukt C (unten)

In dem in Abbildung 3.29 gezeigten Chromatogramm kann man drei Peaks (Einzelpeak bei 5 min mit  $m/z = 252$  und ein Doppelpeak bei 6 min mit jeweils  $m/e = 324$ ) die Masse von mehrfach silyliertem OPD zuordnen. Auch Xylose (Doppelpeak, *syn*- und *anti*-Form mit  $m/e = 497$ ) liegt noch in größerer Menge in der Probe vor. Die grün markierten Peaks lassen die drei in bisher allen OPD-haltigen Modellsystemen der eigenen Arbeit vorkommenden Reaktionsprodukte A, B und C in Abbildung 3.29 erkennen. Dass es sich bei den Peaks mit den Massen 436, 526 und 598 jeweils um diese Komponenten A, B und C handelt, lässt sich durch die parallel durchgeführten GC/MS-Messungen bestätigen.

Betrachtet man den unteren Teil der Abbildung, der das GC-FID-Chromatogramm derjenigen Probe zeigt, die bei  $a_w = 0,75$ , also im wassergehaltsabhängigen Maximum der Maillard-Reaktion, gelagert und anschließend auf 140 °C für 30 min erhitzt wurde, so lassen sich die

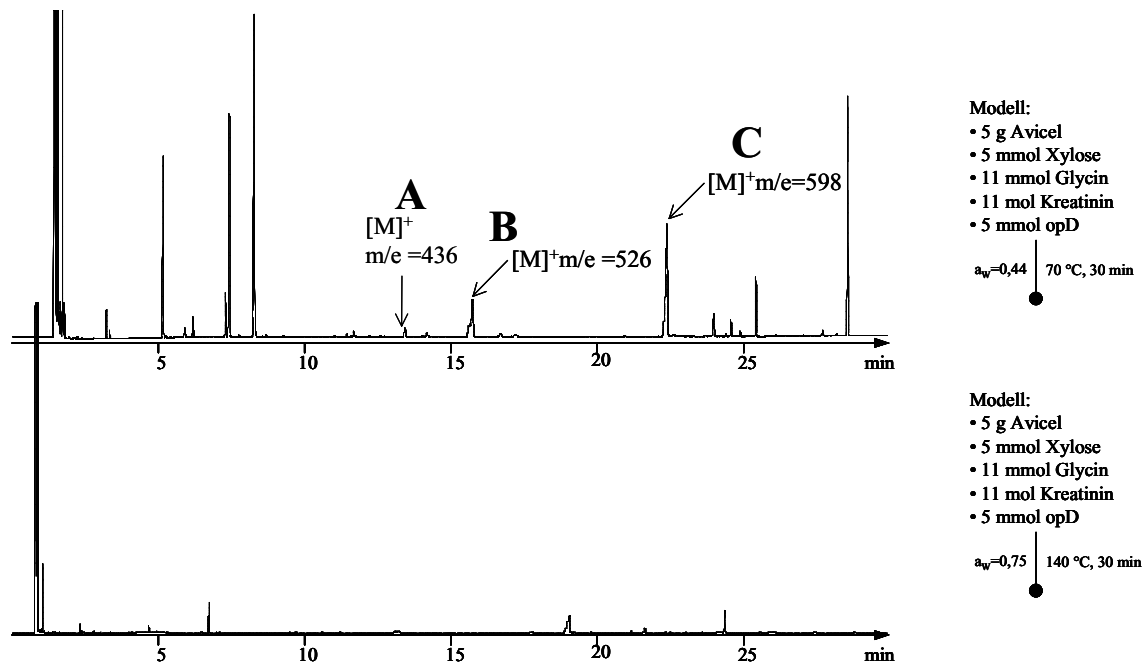
drei Reaktionsprodukte A, B und C mit im Vergleich zu der oben gezeigten Versuchsvariante größeren Mengen erkennen.



**Abbildung 3.29**

GC-FID-Chromatogramm wässriger Extrakte aus Modellsystemen (Xylose+OPD; Lagerung bei Raumtemperatur und  $a_w = 0,44$  bzw.  $0,75$ , 10 Tage, RT). Erhitzung im Trockenschrank, Lyophilisat oximiert und silyliert (Xylit und Trehalose als innerer Standard). Identität der Verbindungen A, B und C siehe Abbildungen 3.26, 3.27 und 3.28

Freies OPD, Xylose (und weitere nicht näher identifizierbare Reaktionsprodukte) sind jedoch nur noch im geringem Maße nachweisbar (rot hervorgehoben). Vergleicht man die in den eigenen Arbeiten untersuchten Proben (nicht abgebildet) aus Modellsystemen miteinander, bei denen jeweils nur ein Parameter variiert wird, so kann man an Hand der betreffenden Chromatogramme feststellen, dass jeweils mit steigender Gleichgewichtsfeuchtigkeit bzw. erhöhter Temperatur die Zahl nachweisbarer Reaktionsprodukte sowie die Menge – wie auch tendenziell aus dem Vergleich der beiden Modelle in Abbildung 3.29 zu sehen – an freiem OPD und noch nicht umgesetzter Xylose abnehmen, die Mengen an den markanten Reaktionsprodukten A, und C jedoch zunehmen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde auf eine Avicel-Matrix Xylose, Glycin, Kreatinin und OPD jeweils im molaren Verhältnis von  $0,5:1:1:0,5$  aufgezogen und analog zur letztbeschriebenen Modellreihe erhitzt und analysiert. Gemäß der Bildungspostulat nach Jägerstad („Las Vegas Hypothese“, vgl. Kapitel 1.1.3) können sich aus den drei Edukten Xylose, Glycin und Kreatinin bei ausreichender Erhitzung u. a. HAAs als Reaktionsprodukte bilden.

**Abbildung 3.30**

GC-FID-Chromatogramm wässriger Extrakte aus Modellsystemen (Xylose+OPD+Glycin+Kreatinin; Lagerung bei  $a_w = 0,44$  bzw.  $0,75$ , 10 d, RT). Lyophilisat oximiert und silyliert (Xylit und Trehalose als innerer Standard), Erhitzung im Trockenschrank

Durch den Zusatz von OPD zu diesen Edukten besteht die Möglichkeit, bei der zur Bildung der HAAs führenden Reaktion intermediär gebildete  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen abzufangen (Fachbegriff: zu trappen). Auch bei derartigen Modellsystemen ist zu erkennen, dass eine erhöhte Gleichgewichtsfeuchtigkeit während der Lagerung sowie eine höhere gewählte Temperatur bei der anschließenden Erhitzung das Produktspektrum reduzieren. Wie in Abbildung 3.30 zu sehen, reduziert sich das Produktspektrum einer Probe, die bei  $a_w = 0,75$  gelagert und anschließend für 30 min auf 140 °C erhitzt wurde, auf einige wenige, nicht zuzuordnende Peaks. Es sind keine Reaktionsprodukte wie bei nur Xylose und OPD-enthaltenden Modellsystemen zu erkennen. Vielmehr müssen auch eventl. auftretende technische Probleme wie Verstopfung des Einspritzliners mit nicht- bzw. schwerflüchtigen Bestandteilen aus den Probenlösungen mit in die Betrachtung genommen werden. Die als innere Standards für eine mögliche quantitative Auswertung zugesetzte Trehalose und das Xylit lassen sich nicht mehr nachweisen, obwohl diese, da sie erst zur Derivatisierung zugesetzt werden, üblicherweise nicht mit Reaktionsprodukten reagieren. Anhand der tiefroten Farbe der entsprechenden oximierten und silylierten Probenlösungen – eine entsprechende Probelösung aus einem Ansatz mit OPD und Xylose aber nur schwach gelb gefärbt – kann man darauf schließen, dass vermehrt Kondensationsreaktionen stattgefunden haben. An hochmolekulare Kondensationsverbindungen können die inneren Standards, besonders unter der Temperatureinwirkung wäh-

rend der Derivatisierung, adsorptiv gebunden werden und sich so der gaschromatographischen Analyse entziehen.

Für die Auswertung von Pentose, Aminosäure, Kreatinin und OPD enthaltenden Modellsystemen ergibt sich damit, dass anhand von Modellsystemen, die über 100 °C erhitzt wurden, keine gesicherten Aussagen getroffen werden können.

Nach Glomb ließe sich die Bildung der Reaktionsprodukte A, B und C in wasserarmen OPD-haltigen Modellsystemen zwar als Oxidation der möglicherweise nur intermediär entstehender Pentose-Amadori-Verbindung zu der entsprechenden 2-Pentosulose mit anschließender Chinoxalinbildung (A) bzw. Ausbildung einer SCHIFF'schen Base (B, C) erklären. Für diesen Bildungsweg müsste ein Teil des OPD durch Luftsauerstoff zum Chinoximin (vgl. Kapitel 3.1.5.2) oxidiert werden, das wiederum als Oxidationsmittel für Pentose-Amadori-Verbindungen zu den entsprechenden 2-Pentosulosen fungiert. Da aber die Modellsysteme unter verminderten Atmosphärendruck gelagert worden sind und Proben dieser Modellsysteme in geschlossenen Gefäßen erhitzt wurden, ist die Oxidation des OPD durch Luftsauerstoff nahezu auszuschließen. Die Bildung der in OPD-haltigen Modellsystemen als entsprechende Chinoxalinderivate abgefangenen 2-Pentosulosen muss daher entweder über die Autoxidation der entsprechenden Pentose-Amadori-Verbindung durch Anwesenheit katalytischer Mengen an Sauerstoff (vgl. Kapitel 1.1.1) oder einen weiteren noch unbekanntem Weg erfolgen. Der aus der Menge am entsprechenden Chinoxalinderivat ableitbare Gehalt an gebildeten 2-Pentosulosen in den unterschiedlichen Modellsystemen kann damit als Marker der stattgefundenen frühen Phase der Maillard-Reaktion gesehen werden.

### **3.5.2.3 Vorbemerkung zur quantitativen Auswertung von Modellsystemen mit OPD als Abfangreagenz**

Die Auswahl einer geeigneten Bestimmungsmethode von Chinoxalinderivaten mittels GC-MS-EI wurde bereits umfangreich in Kapitel 3.4.2 beschrieben. Die quantitative Bestimmung der Mengen an entstandenen Reaktionsprodukten der in den eigenen Arbeiten untersuchten Modellsysteme mit OPD als Abfangreagenz (vgl. Tabellenwerk 3.5) erfolgte über Xylit oder alternativ über Trehalose als innerem Standard. Sie sind bereits im Oximierungsreagenz enthalten und werden so bei der Derivatisierung der gefriergetrockneten wässrigen Extrakte der in Rede stehenden Modellsysteme zugesetzt (vgl. Kapitel 6.8.5.2). Um die Analysenwerte miteinander vergleichen zu können, ist eine einheitliche Bezugsgröße wichtig. Es ist sinnvoll, die Mengen der entstandenen Reaktionsprodukte in mmol pro mol der ursprünglich im Modellansatz vorhandenen Pentose anzugeben. Da nur eine Reaktionsprodukt, das Chinoxalinde-

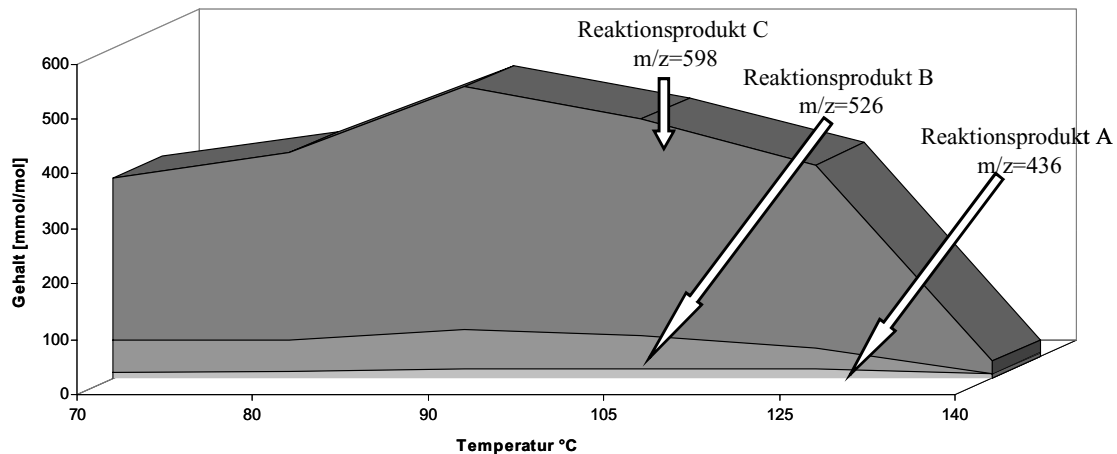


riyat der entsprechenden 2-Pentosulose, eindeutig identifizierbar ist, wird die Menge an den jeweiligen drei bei der Reaktion gebildeten Komponenten A, B und C als mmol der entsprechenden als „2-Pentosulose pro mol Pentose“ ausgedrückt. Bei den jeweiligen Berechnungen wurde von dem analytisch bestimmten Chinoxalinderivat A der jeweiligen 2-Pentosulose auf die 2-Pentosulose zurückgerechnet und auf die anteilige Menge der ursprünglich zugesetzten Pentose bezogen. Für die weiteren identifizierbaren Reaktionsprodukte B und C wurde hypothetisch angenommen, dass sich die unterschiedlich silylierte SCHIFF'sche Base hinsichtlich der analytischen Bestimmung wie das entsprechende Chinoxalinderivat der jeweiligen 2-Pentosulose verhält. Da die entsprechenden Chinoxalinderivate nicht in isolierter Form vorlagen, konnte kein entsprechender Responsefaktor bestimmt werden. Er wurde zur Vereinfachung auf den Wert 1 festgelegt. Ein umfangreiches Berechnungsschema findet sich in den Arbeitsvorschriften unter Kapitel 6.8.3.2.

Die Flächen der im GC-Chromatogramm erscheinenden Peaks der Probenkomponenten können sowohl aus integrierten GC-FID- als auch aus integrierten GC/Quadrupol-MS-Chromatogrammen (Beispiele finden sich im Anhang unter Kapitel 8.7) entnommen werden. Betrachtet man die temperaturabhängige Bildungsrate der vorliegenden Hauptkomponenten eines Xylose-OPD-Glycin-Kreatinin-Modelles in ihrer oximierten und silylierten Form (genaue Beschreibung der Zusammensetzung unter Kapitel 6.5.2 Messreihe 1) zum einen über die Berechnung anhand von integrierten GC-FID-Chromatogrammen (Abb. 3.31) und zum anderen anhand von integrierten GC/Quadrupol-MS -Chromatogrammen (Abb. 3.32), so zeigen sich deutliche Unterschiede in der Quantifizierung der Reaktionsprodukte.

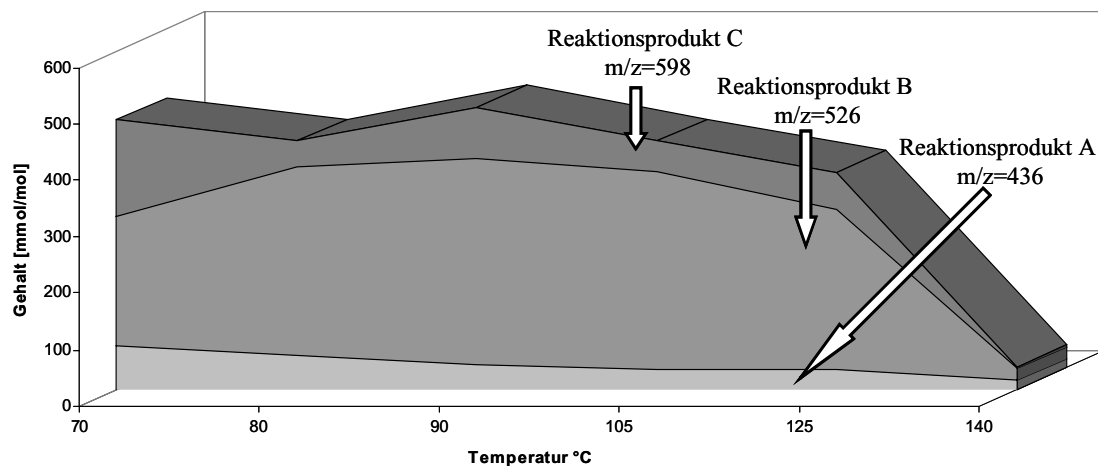
Die Berechnung der Summe der gebildeten Reaktionsprodukte über GC-FID bzw. GC/Quadrupol-MS führt zu nahezu vergleichbaren Ergebnissen. Der Anteil der Komponenten an der Summe ist jedoch unterschiedlich. Hierbei zeigen sich deutliche Unterschiede, die im Prinzip des jeweiligen Integrationsverfahrens liegen.

Die Integration bei der GC-FID erfolgt anhand der gemessenen Signale am Flammenionisationsdetektor. Ob die verschiedenen Reaktionsprodukte einen unterschiedlichen Response bei der Verbrennung haben, ist zwar unklar, jedoch ist das aufgezeichnete Signal direkt proportional zur verbrannten Menge an Analyten im Detektor. Die Mengen an entstandenen Reaktionsprodukte können zwar aufgrund fehlender Responsefaktoren nicht präzise absolut bestimmt werden können; jedoch ist das physikalische Prinzip der Detektion matrixunabhängig, so dass Modellsysteme mengenmäßig miteinander verglichen werden können. Die Integration bei der GC/Quadrupol-MS erfolgt anhand der Aufsummierung der Intensitäten aller aufgenommenen Fragmente einer detektierten Substanz.



**Abbildung 3.31**

Temperaturabhängige Bildung bzw. Abbau der Reaktionsprodukte (Gehalt in [mmol 2-Xylosulose/mol Xylose im Modell]) eines Xylose-OPD-Glycin-Kreatinin-Modelles (Lagerung 10 Tage bei  $a_w = 0,52$ , RT; anschließend 30 min erhitzt, Temperatur variabel); Berechnung über integrierte GC-FID-Chromatogramme



**Abbildung 3.32**

Temperaturabhängige Bildung bzw. Abbau der Hauptkomponenten (Gehalt in [mmol 2-Xylosulose/mol Xylose im Modell]) eines Xylose-OPD-Glycin-Kreatinin-Modelles (Lagerung 10 Tage bei  $a_w = 0,52$ , RT; anschließend 30 min erhitzt, Temperatur variabel); Berechnung über integrierte GC-MS-Chromatogramme im Scan-Modus

Oft ist die Intensität der einzelnen Fragmente nicht nur von ihrer Menge abhängig, sondern auch von ihrer Fähigkeit, im Sekundär-Elektronen-Vervielfacher (Detektoreinheit im GC/MS-System, Funktionsweise siehe Kapitel 2.3.4.2) Initialelektronen zu produzieren.

Diese Initialelektronen setzen nachfolgend eine Vielzahl weiterer Elektronen frei, welche dann letztendlich detektiert werden. Somit ergibt sich der Effekt, dass, wenn eine Substanz unter verschiedenen Bedingungen unterschiedlich fragmentiert, die Summe der Intensitäten der einzelnen Fragmente nicht gleich sein muss. Die Art der Fragmentierung beeinflusst somit die Integration bei der GC/Quadrupol-MS. Bereits Änderungen der Matrix oder eine hohe Anzahl weiterer Analyten beeinflussen das Fragmentierungsverhalten. Um dennoch eine über alle derivatisierten Modellansätze reproduzierbare Quantifizierung durchführen zu können, könnte man entweder die Detektion über den SIM-Modus (Selected-Ion-Monitoring, vgl. Ka-

pitel 2.3.4.5 Abschnitt III) oder die GC/Quadrupol-MS mit chemischer Ionisation (vgl. Kapitel 2.3.4.5 Abschnitt I) nutzen. Der SIM-Modus ist nicht sinnvoll anwendbar, da die für die einzelnen Reaktionsprodukte charakteristischen Fragmente nur eine geringe Intensität aufweisen. Bei der GC/Quadrupol-MS mit chemischer Ionisation (Ammoniak, Methan) entsprechender oximierter und silylierter Extrakte aus Proben der zu betrachtenden Modellsysteme lassen sich außer dem silylierten Xylit und der silylierten Trehalose weder die Hauptkomponente A, B, C noch weitere nach Stoßionisation detektierbare aber nicht identifizierbare Substanzen detektieren (Beispielchromatogramm unter Kapitel 8.7.3). Die Reaktionsprodukte werden wahrscheinlich erst gar nicht ionisiert, da bei Kohlenhydraten bekannt ist, dass nur „harte“ Ionisierung aussagekräftige Fragmentierungen liefert.

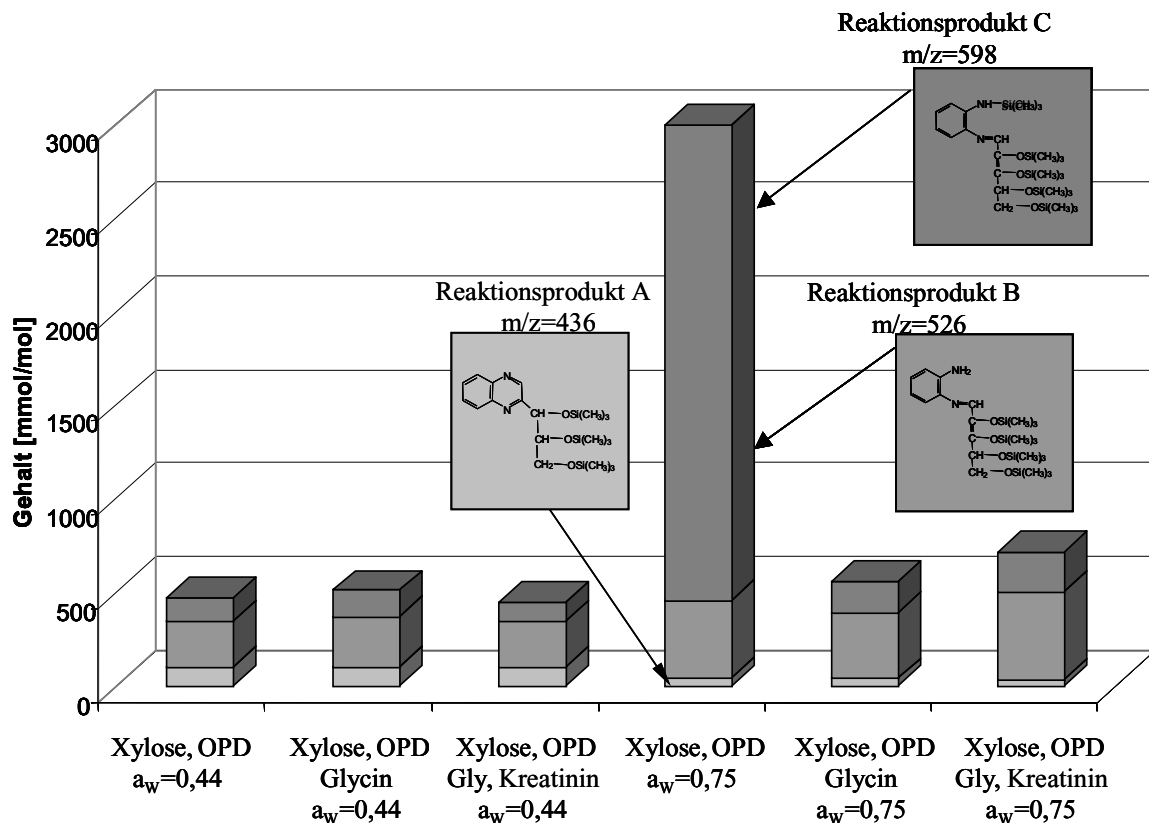
Aufgrund der dargestellten Vorzüge wird für die Quantifizierung der Reaktionsprodukte die GC-FID-Integration verwendet.

#### **3.5.2.4 Vergleich der in verschiedenen Avicel-Modellsystemen gebildeten Reaktionsprodukte**

Bei den nachfolgend beschriebenen Auswertungen werden die bestimmten Gehalte der Reaktionsprodukte A, B und C in wasserarme Avicel-Modellsysteme mit Zusatz von OPD – die Zusammensetzung dieser wurde bereits umfassend im vorangegangenen Kapitel zur qualitativen Auswertung der Trapping-Versuche mit OPD (vgl. Kapitel 3.5.2.2) beschrieben – unter Berücksichtigung der Modellzusammensetzung miteinander verglichen. Das Ziel auch dieser Auswertungen war es, den Einfluss der Reaktionsbedingungen (Lagerung bei unterschiedlichen Gleichgewichtsfeuchtigkeiten, Erhitzung auf verschiedene Temperaturen) auf die Reaktionswege eines Pentose-Aminosäure- bzw. eines Pentose-Aminosäure-Kreatinin-Gemisches im wasserarmen Milieu zu klären (vgl. Kapitel 1.2). Da OPD neben der Funktion als Abfangreagenz durch Chinoxalinbildung auch direkt mit den intermediär gebildeten 2-Pentosulosen reagieren kann, lassen sich nur partielle Aussagen über Bildung sowie lagerungs- und temperaturabhängige Bildungs- bzw. Abbauraten der hier betrachteten Reaktionsprodukte A, B und C (vgl. Kapitel 3.5.2.2) treffen. Zur Verdeutlichung werden hier nur beispielhaft Ergebnisse aus den durchgeführten Untersuchungen (vgl. Anhang, Kapitel 8.9) wiedergegeben. Da die Bildung der Reaktionsprodukte B und C, die jeweils unterschiedlich silylierte SCHIFF'sche Basen der entsprechenden 2-Pentosulose mit OPD (vgl. Abb. 3.27 und Abb. 3.28) darstellen, eher eine störende Nebenreaktion ist, soll primär die Bildung des Chinoxalins der im Verlauf der Reaktion gebildeten 2-Pentosulose (Verbindung A) betrachtet werden. Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse geben die Bildung der in den wasserarmen Avicel-Modellsystemen

gebildeten Reaktionsprodukte A, B und C in den oximierten und silylierten gefriergetrockneten wässrigen Probenextrakten wieder. Die Herstellung und Zusammensetzung der unterschiedlichen wasserarmen Avicel-Modellsysteme mit OPD als Trappingreagenz mit Xylose, mit und ohne Glycin und Kreatinin sind den Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.5.2, zu entnehmen. Die Modellsysteme wurden jeweils bei verschiedenen  $a_w$ -Werten gelagert und anschließend bei 70 °C für 30 min erhitzt. Die nachgewiesenen Mengen an den Reaktionsprodukte B und C müssen jeweils immer zusammen gesehen werden, da sie ja Silylierungsprodukte einer einzigen Verbindung, nämlich der SCHIFF'schen Base aus der entsprechenden 2-Pentosulose und OPD, darstellen.

In Abbildung 3.33 kann man erkennen, dass die Bildung des Chinoxalins der 2-Xylosulose (Reaktionsprodukt A) in den beschriebenen Modellsystemen bei der höheren Wasseraktivität abnimmt, während die Bildung der SCHIFF'schen Basen aus 2-Xylosulose und OPD (Verbindungen B und C) zunimmt. Die Anwesenheit von Glycin und Kreatinin hat keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des Chinoxalins der gebildeten 2-Xylosulose.

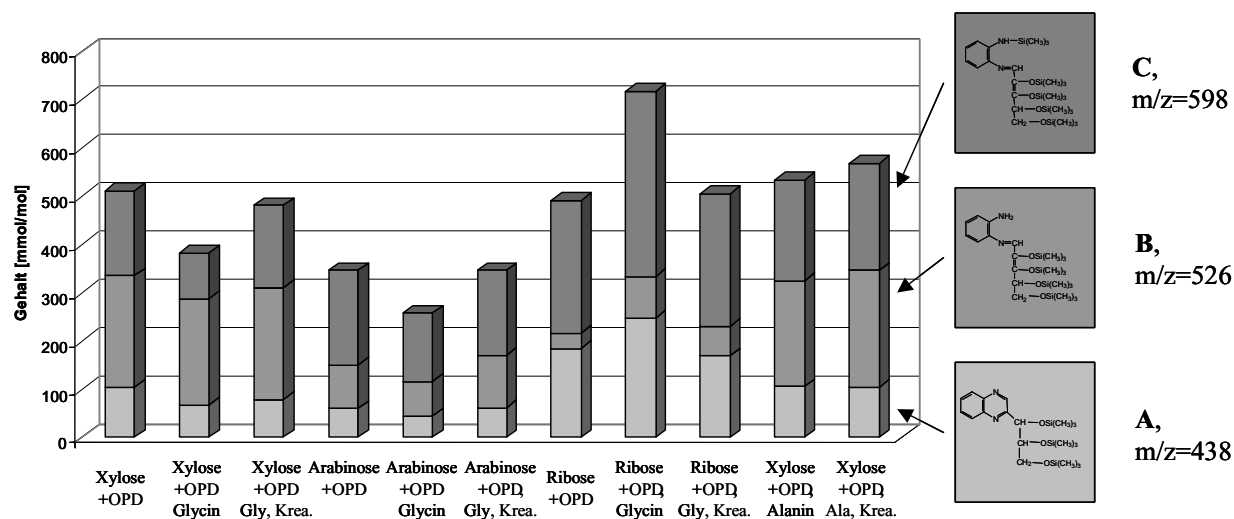


**Abbildung 3.33**

Unterschiedliche Bildung der Reaktionsprodukte (Gehalt einheitlich umgerechnet in [mmol 2-Xylosulose/mol Xylose im Modell]) in Abhängigkeit von Zusammensetzung und Gleichgewichtsfeuchtigkeit während der Lagerung (RT, 10 Tage); Erhitzung im Trockenschrank bei 70 °C; Bestimmung erfolgte nach Oximierung und Silylierung des Lyophilisats; genaue Zusammensetzung unter Kapitel 6.5.2 Messreihe II

Bemerkenswert ist jedoch, dass das Reaktionsprodukt C bei der höheren Wasseraktivität in Gegenwart von Glycin, offensichtlich wegen der Konkurrenzreaktion der Xylose mit dem Glycin, stark abnimmt. Auffällig ist auch, dass das Reaktionsprodukt C bei der höheren Wasseraktivität in weit höherem Maße gebildet wird als bei der niedrigeren Wasseraktivität.

In Abbildung 3.34 ist der Vergleich der Reaktivität von Xylose, Ribose und Arabinose dargestellt.



**Abbildung 3.34**

Abhängigkeit der Bildung der Reaktionsprodukte (Gehalt einheitlich umgerechnet in [mmol 2-Pentosulose/mol Pentose im Modell]) in Abhängigkeit von der Zusammensetzung (verschiedene Zucker- und Aminosäurekomponenten; Lagerung erfolgte bei  $a_w = 0,52$ , RT, 10 Tage); Erhitzung im Trockenschrank bei 70 °C; Bestimmung erfolgte nach Oximierung und Silylierung des Lyophilisat; genaue Zusammensetzung unter Kapitel 6.5.2 Messreihe III

Die höchsten Bildungsraten von 2-Pentosulose sind bei den Modellsystemen auf Ribosebasis zu beobachten. Auffällig ist hier, dass das Ribose-OPD-Glycin-Modell mit 248 mmol 2-Ribosulose/mol Ribose die höchsten in eigenen OPD-haltigen Modellsystemen auf Avicel-Basis bestimmten Gehalte an einer 2-Pentosulose aufweist. Ist in derartigen Ribose-Modellen noch zusätzlich Kreatinin enthalten, so ist die Bildung an 2-Ribosulose geringer. Die Pentose Arabinose enthaltenden Modellsysteme weisen durchweg niedrigere Gehalte an entstandener 2-Pentosulose auf.

Ersetzt man in Xylose enthaltenden Modellsystemen die Aminosäure Glycin durch Alanin, so verändert sich die Bildungsrate des 2-Xylosulose gegenüber einem nur Xylose und OPD enthaltenden Modellsystem nicht. Dagegen deutet es sich an, dass in den Modellsystemen mit Xylose in Gegenwart von Alanin größere Mengen an 2-Pentosulose gebildet wurden als in den Glycin enthaltenden Modellsystemen.

In weiteren Arbeiten (vgl. folgendes Kapitel) wurde versucht, die gaschromatographisch trennbaren Reaktionsprodukte, wie die Chinoxaline der 2-Pentosulosen und mögliche Pento-

se-OPD-Umsetzungsprodukte, die in entsprechenden wasserarmen Avicel-Modellen entstehen und mit Wasser extrahiert werden können, auch per HPLC zu trennen und anschließend zu fraktionieren.

### **3.5.2.5 Trennung und Nachweis von OPD-Reaktionsprodukten aus wasserarmen Modellsystemen mit HPLC-UV/VIS und HPLC-DAD**

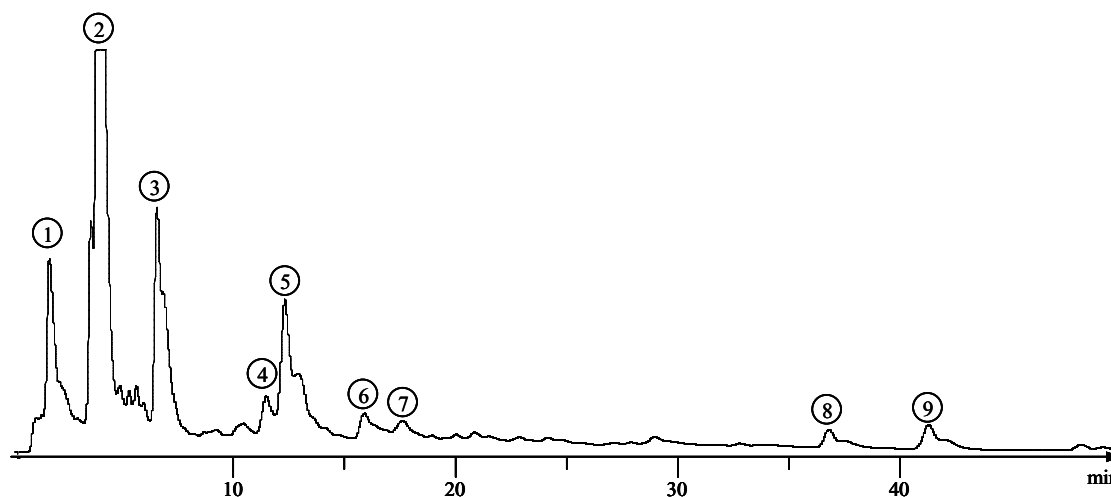
HPLC-Trennungen von Reaktionsprodukten zwischen intermediär gebildeten Carbonylverbindungen und OPD in wässrigen Modellsystemen an einer RP-18-Phase mit einem Acetonitril-Ammoniumformiat-Eluenten wurden bereits von Hofmann et al. [Lit. 99] durchgeführt. Morita und Takagi [Lit. 192] erarbeiteten eine HPLC-Trennung von Chinoxalinen aus wässriger Matrix an einer RP-18-Phase mit einem Methanol-Acetonitril-Wasser-Eluenten.

Die in diesen Arbeiten verwendeten Referenzverbindungen wie die Chinoxaline des 1- bzw. 3-Desoxyosons der Xylose sind durch geeignete Synthesen zugänglich [Lit. 98, 103]. Das Chinoxalin der 2-Xylosulose (Xyloson) kann man durch Umsetzung mit OPD gewinnen; die komplexe Synthese dieses Chinoxalins wurde erstmalig im Jahr 1952 von Bors et al. [Lit. 241] beschrieben. Physikalische Daten wie Schmelzpunkt und Brechungsindex sowie spektroskopische Daten, wie Absorptionsmaxima im UV/VIS-Bereich, Lage der Absorptionsbanden im IR, Verschiebungen bei der  $^1\text{H-NMR}$  und  $^{13}\text{C-NMR}$ , wurden von Morita et al. [Lit. 191] für das Chinoxalin des Xylosons beschrieben (Auflistung siehe Anhang, Kapitel 8.6). Somit ist eine Reinheitsüberprüfung der gewonnenen Fraktionen möglich.

In den eigenen Arbeiten wird für die HPLC-Trennungen eine binäre Gradientenelution mit Acetonitril und Ammoniumformiat gewählt. Allgemein werden Chinoxalinderivate bei einer Messwellenlänge von  $\lambda = 310$  nm photometrisch mittels UV-VIS-Detektor oder DAD detektiert. Vorversuche mit HPLC-UV/Vis (vgl Kapitel 6.8.1.2) an einer chemisch gebundenen Umkehrphase ergaben, dass im wässrigen Extrakt von wasserarmen neben Xylose, Glycin und Kreatinin auch noch OPD als Trapping-Reagenz enthaltenden und entsprechend erhitzten Avicel-Modellsystemen zahlreiche Komponenten getrennt und detektiert werden können. Um die Identität der Peaks bestimmen zu können – eine entsprechende HPLC-MS/MS-Anlage stand zu dem Zeitpunkt dieser Untersuchungen nicht zur Verfügung –, wurde mit den optimierten Trennparametern des analytischen HPLC-Laufes versucht, die Komponenten an einer semipräparativen HPLC-RP-Säule zu trennen und das Säulenuat zu fraktionieren. Die einem Peak zuzuordnenden Fraktionen wurden gesammelt; das Laufmittel wurde entfernt und der verbleibende Rückstand mittels GC-MS-EI nach Oximierung und Silylierung näher unter-

sucht. Eine klare Zuordnung der in dem in Abbildung 3.35 dargestellten Chromatogramm erkennbaren Peaks (mit 1 - 9 bezeichnet) war jedoch nicht möglich.

Allgemein ist zu bemerken, dass die Auswertung entsprechender Chromatogramme im Hinblick auf die Möglichkeit einer geeigneten Fraktionierung sich schwierig gestaltet, da viele Peaks nicht basisliniengetrennt werden konnten und im Chromatogramm eine Schulterbildung zeigten.

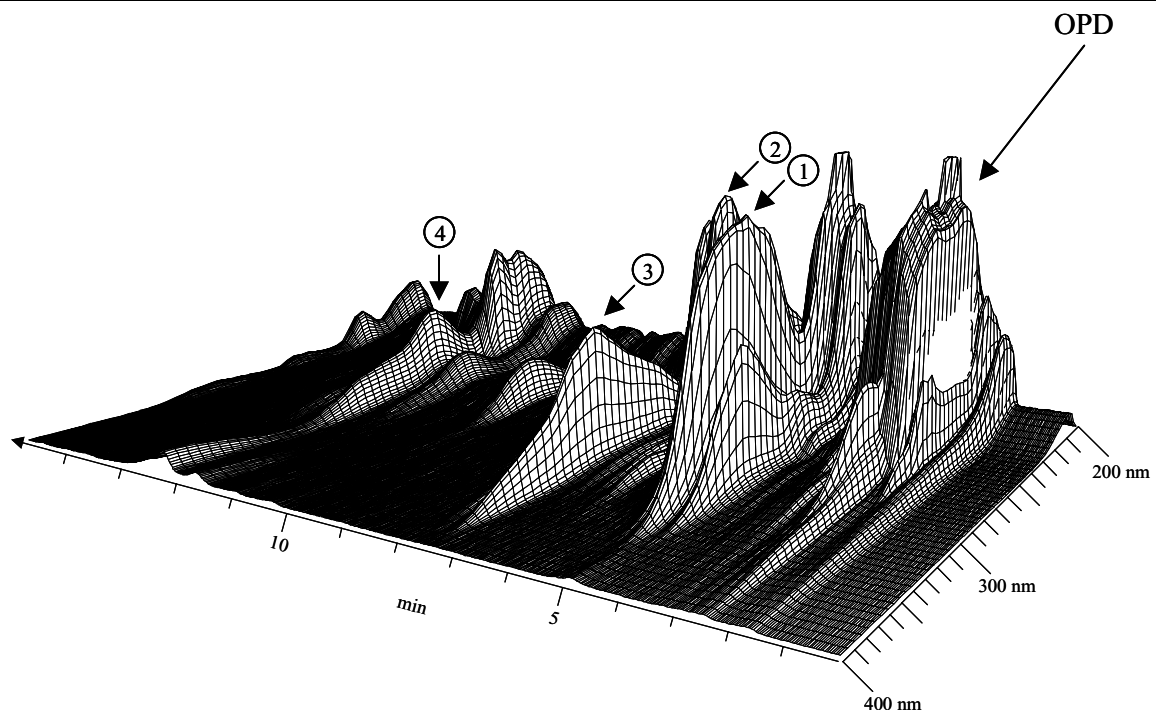


**Abbildung 3.35** HPLC-UV/Vis-Chromatogramm (bei  $\lambda = 310$  nm) einer semipräparativen Trennung (vgl. Kapitel 6.8.1.4) von Bestandteilen einer mit Laufmittelgemisch extrahierten Probe eines Xylose-, OPD-, Glycin- und Kreatinin-haltigen wasserarmen Avicel-Modellsystems (vgl. Abb. 3.31); Gerät: HPLC1 (vgl. Kapitel 6.8.1.1); LiChrospher 100 RP-18e ( $10 \mu\text{m}$ );  $250 \times 10$  mm; Mobile Phase A: wässrige Ammoniumformiatlösung (30 mM, pH 3,5); mobile Phase B: Acetonitril Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 90+10, 50 min: 70+30, 50 min; Flussrate 5 ml/min, Injektionsvolumen  $200 \mu\text{l}$ ; den verschiedenen Peaks (1 - 9) zuordnenbare Fraktionen des Säuleneeluats wurden aufgefangen und mittels GC-MS-EI (vgl. Kapitel 6.8.5.3) untersucht: keine Peakzuordnung möglich

Eine Betrachtung der aufgetrennten Komponenten in der dreidimensionalen Darstellung eines DAD-Chromatogrammes (vgl. Abb. 3.36) ist daher sinnvoll.

Auf diese Weise kann man feststellen, ob im entsprechenden UV/VIS-Chromatogramm ein zur Schulterbildung neigender Peak einer Komponente zugeordnet werden kann oder ob der Peak die Summe nahezu gleichzeitig eluierender Komponenten darstellt. Dies kann man an einem unterschiedlichen Absorptionsverhalten am Peakanfang bzw. -ende in der 3D-Darstellung eines DAD-Chromatogramms erkennen.

Mit HPLC-DAD an einer analytischen Säule mit chemisch gebundener Umkehrphase (vgl. Kapitel 6.1.8.3) lassen sich, wie in Abbildung 3.36 ersichtlich, mehrere Verbindungen in einem Extrakt auftrennen, der durch Extrahieren eines Xylose, OPD, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystems (Zusammensetzung siehe Kapitel 6.5.2 Messreihe I) hergestellt wurde. Nach etwa zwei Minuten kann man das charakteristische Absorptionsverhalten des



**Abbildung 3.36**

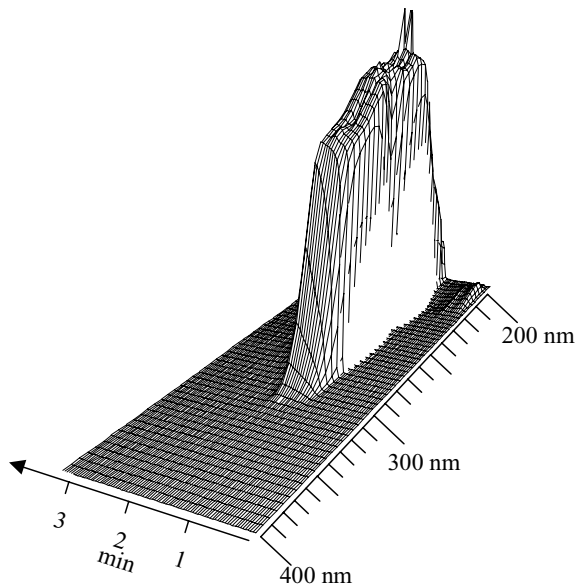
HPLC-DAD-Chromatogramm in der 3D-Ansicht einer analytischen Trennung (vgl. Kapitel 6.8.1.3) von Bestandteilen einer mit Laufmittelgemisch extrahierten Probe eines Xylose-, OPD-, Glycin- und Kreatinin-haltigen wasserarmen Avicel-Modellsystems (vgl. Abb. 3.31); Gerät: HPLC2 (vgl. Kapitel 6.8.1.1); LiChrospher 100 RP-18e (5  $\mu\text{m}$ ); 250 x 10 mm; Mobile Phase A: wässrige Ammoniumformiatlösung (30 mM, pH 3,7); mobile Phase B: Acetonitril Gradient (Teile A + Teile B): 0 min: 90+10, 50 min: 70+30, 50 min; Flussrate 1 ml/min, Injektionsvolumen 10  $\mu\text{l}$ ; den verschiedenen Peaks (1-4) zuordnenbare Fraktionen des Säuleneluats wurden aufgefangen und mittels GC-MS-EI (vgl. Kapitel 6.8.5.3) untersucht, um Peaks zuzuordnen

überschüssigen OPDs erkennen. Dieses Absorptionsverhalten sieht man noch deutlicher in einem 3D-Chromatogramm einer mit den gleichen Trennparametern durchgeführten HPLC-Analyse von OPD, das zuvor im Laufmittelgemisch gelöst wurde (vgl. Abb. 3.37). Davon ausgehend, dass Chinoxaline ein charakteristisches Absorptionsverhalten bei  $\lambda = 230 \text{ nm}$  bis  $240 \text{ nm}$  und  $\lambda = 310 \text{ nm}$  bis  $320 \text{ nm}$  zeigen, kann man in dem in Abbildung 3.36 dargestellten Chromatogramm drei Bereiche erkennen, die auf ein Vorhandensein von Chinoxalinderivaten hindeuten. Ein erster Bereich ist zwischen 4,5 und 6 min Laufzeit zu sehen. Aufgrund des leicht unterschiedlichen Absorptionsverhaltens sind dort zwei angetrennte Verbindungen (1,2) zu vermuten. In einem zweiten Bereich ist ein Peak (3) mit einem für Chinoxaline charakteristischen Absorptionsverhalten etwa bei 7 min zu sehen, und ein dritter Bereich, ist wiederum mit einem Peak (4) bei 12,5 min zu erkennen.

Es ist ausgehend vom jeweiligen Absorptionsverhalten zu vermuten, dass im untersuchten Extrakt vier Verbindungen mit Chinoxalinstruktur enthalten sind.

Im weiteren konnten in den eigenen Arbeiten die zuvor schon optimierten HPLC-Trennung an einer semipräparativen RP-18e-Säule mit einem Acetonitril-Ammoniumformiat-Eluenten dahingehend optimiert werden, dass durch geeignete Fraktionierung vier Verbindungen in vier unterschiedlichen Fraktionen aufgefangen werden können (vgl. Kapitel 6.8.1.4).



**Abbildung 3.37**

HPLC-DAD-Chromatogramm in der 3D-Ansicht einer analytischen Trennung (vgl. Kapitel 6.8.1.3) von in Laufmittelgemisch gelöstem OPD, weitere Parameter vgl. Abbildung 3.36

In einer Fraktion (vergleichbar mit der Fraktion 3 in Abb. 3.35) konnte das Chinoxalin der 2-Xylosulose nach Oximierung und Silylierung eines nach Entfernung des Acetonitrils gefriergetrockneten Aliquots mittels GC-MS-EI (vgl. Kapitel 6.8.5.3) in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden. Zur Anreicherung möglicher in den einzelnen Fraktionen enthaltener Chinoxaline wurden diese mit n-Butanol ausgeschüttelt (Arbeitsweise nach Liedke [Lit. 159]). Die nach mehrfacher Extraktion erhaltene organische Phase wurde vereinigt und anschließend zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in einem definierten Volumen eines Methanol/Wasser-Gemisches aufgenommen. Ein aliquoter Teil wurde zur gaschromatographischen Bestimmung der Chinoxaline nach Oximierung und Silylierung eingesetzt. Auch nach Aufreinigung konnte neben dem Reaktionsprodukt aus dem Xyloson und OPD kein weiteres Chinoxalin nachgewiesen werden.

Da aber die SCHIFF'sche Base von 2-Xylosulose mit OPD jeweils unterschiedlich silyliert mittels GC-MS als Reaktionsprodukt B und C nachgewiesen werden kann, ist davon auszugehen, dass diese im Rahmen der Reaktion von 2-Xylosulose und OPD entstandene Komponente auch im wie oben beschrieben mittels HPLC untersuchten Extraktes enthalten sind; jedoch konnte die SCHIFF'sche Base nicht isoliert werden und somit nicht einem Peak im HPLC-Chromatogramm wie etwa in Abbildung 3.35 oder 3.36 zugeordnet werden. Um eine Zuordnung der Peaks dennoch zu ermöglichen, muss auf die HPLC-MS/MS-Analytik zurückgegriffen werden, die zum Zeitpunkt der beschriebenen Untersuchungen jedoch nicht zur Verfügung stand.

### **3.6 Bildung von HAAs in Einkomponentensystemen mit Glycin als Aminosäure**

Bei den in den eigenen Arbeiten untersuchten so genannten Einkomponentensystemen mit Glycin handelt es sich um wasserarme Avicel-Modellsysteme, die neben Glycin und Kreatinin noch jeweils eine weitere Komponente enthalten (zur Herstellung vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.5.3).

Bei diesen weiteren, als Reaktionspartner zugefügten Komponenten handelt es sich entweder um in Lebensmitteln vorkommende oder bei der Erhitzung aus Lebensmittelbestandteilen im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten Carbonylverbindungen. Hierbei soll untersucht werden, inwieweit diese in unterschiedlichen Mengenanteilen zugesetzte Komponente Einfluss auf Art und Menge der im Reaktionsgemisch gebildeten HAAs ausübt.

Zur Bestimmung von HAAs wurden die Modellsysteme nach entsprechender Erhitzung – wie in Kapitel 3.1.5.5 beschrieben – mit Salzsäure extrahiert und weiteren Isolierungs- und Aufreinigungsschritten zugeführt. Der qualitative Nachweis und die quantitative Bestimmung wurden mittels HPLC-DAD über den eingesetzten Standard 4,7,8-TriMeIQx durchgeführt. Eine Absicherung der qualitativen Analyse erfolgte durch HPLC-MS/MS (siehe Kapitel 6.8.2.2). Entstandene HAAs können anhand ihrer charakteristischen Tochterionen identifiziert werden (vgl. Kapitel 2.3.3.4). Die GC/MS nach Überführung der HAAs in tert.-Butylsilyl-derivate (siehe Kapitel 6.9.6) diene ebenfalls der strukturellen Absicherung gebildeter HAAs im SCAN-Modus sowie der Bestätigung der gebildeten Mengen an HAAs mit einer anderen unabhängigen Bestimmungsmethode mittels eines im SIM-Modus betriebenen Quadrupol-Massenspektrometers (vgl. Kapitel 2.3.5.7).

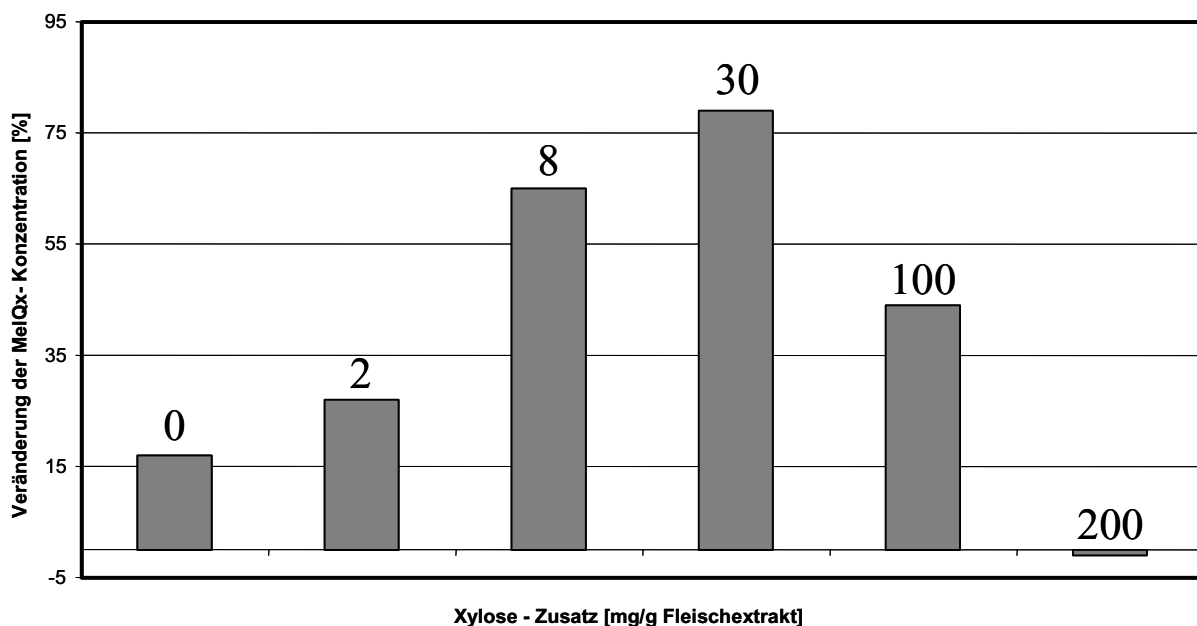
Es kann vorkommen, dass bei gleicher Zusammensetzung hinsichtlich der Art und Menge der zur Reaktion eingesetzten Komponenten und trotz der Bemühungen, immer gleiche Lagerungs- und Erhitzungsbedingungen einzuhalten, bei den verschiedenen untersuchten Einkomponenten- und Zweikomponentensystemen unterschiedliche Gehalte an HAAs gebildet werden. In eigenen Untersuchungen zeigte sich z. B., dass unterschiedliche Trockenschränke oder Avicel aus unterschiedlichen Chargen die Menge der gebildeten HAAs beeinflussen können. Die einheitliche und gleichmäßige Körnung der Modellmischung ist ebenfalls für reproduzierbare Messergebnisse wichtig. Da diese Einflüsse bei den eigenen Versuchen innerhalb einer Messreihe konstant gehalten werden, sind die in unterschiedlichen Modellsystemen einer Messreihe gebildeten Mengen an HAAs miteinander vergleichbar. Um gesicherte Aussa-

gen treffen zu können, wurde stets, ein Referenzmodellsystem, meist ein Glucose-Aminosäure-Kreatinin-Modell, in jede Messreihe einbezogen.

### 3.6.1 Einfluss von Xylose und Xyloseabbauprodukten als Carbonylkomponenten auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen

Vollenbröker [Lit. 307] untersuchte in seinen Arbeiten den Einfluss von verschiedenen Zusätzen zu Reaktionsaromen, die nach industriellen Vorgaben im Labor hergestellt wurden, auf die Bildung von HAAs. Bei der industriellen Herstellung von Reaktionsaromen werden neben Fleischextrakt Zusätze wie Cystein, Ascorbinsäure, Thiaminhydrochlorid und Xylose in geschlossenen wässrigen Systemen (65 g Wasseranteil pro 100 g Reaktionsansatz) erhitzt.

Als ein in der Literatur noch nicht beschriebenes, bemerkenswertes Ergebnis zeigte Vollenbröker, dass ein Xylose-Zusatz von 0,2 g/g Fleischextrakt die MeIQx-Bildung gänzlich unterdrückt (Erhitzungstemperatur 120 °C). In weiteren Experimenten untersuchte er die quantitative Abhängigkeit zwischen Xylose-Zusatz und MeIQx-Bildung. Abbildung 3.38 zeigt die Abhängigkeit der MeIQx-Bildung von der zugesetzten Menge an Xylose.



**Abbildung 3.38**

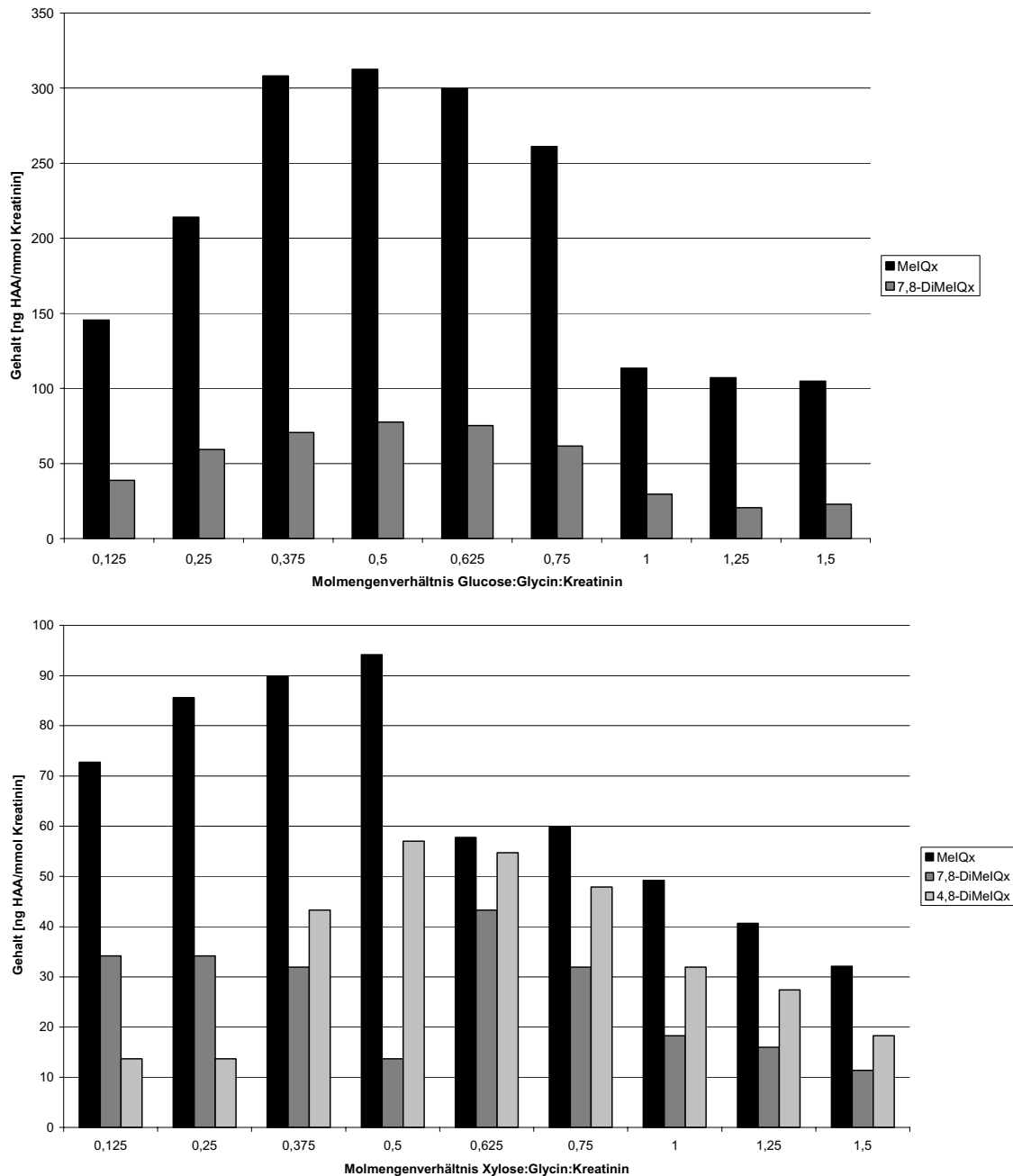
Abhängigkeit der MeIQx-Bildung von der zugesetzten Xylose-Menge zu Fleischextrakt nach Vollenbröker [Lit. 307] (Erhitzungstemperatur 120 °C für 6 h, wässriges geschlossenes System)

Offensichtlich ist ein Zusatz von Xylose ambivalent. So begünstigt einerseits bereits ein Zusatz von ca. 10 mg Xylose/g Fleischextrakt die MeIQx-Bildung deutlich. Andererseits unterdrückt ein Zusatz von 200 mg Xylose die MeIQx-Bildung vollständig. Wie aus der Literatur, explizit aus den Arbeiten von Skog und Jägerstad [Lit. 259], bekannt ist, übt die verfügbare

Menge der einzelnen Reaktanden der Bildungsreaktion von HAAs einen entscheidenden Einfluss auf deren Bildung aus. So steigt in Kreatinin und Aminosäure enthaltenden Modellsystemen mit zunehmender Glucosekonzentration auch die Bildung von mutagenen Verbindungen, von denen die HAAs die mengenmäßig größte Gruppe bilden, zunächst an und erreicht ein Maximum, wenn der molare Anteil der Glucose die Hälfte der molaren Anteile an Kreatinin und an Aminosäure erreicht hat (Verhältnis 1:2:2). Bei weiter ansteigenden Zuckermengen fallen die Mengen der gebildeten HAAs wieder ab. Auch Skog [Lit. 268] beschrieb den ambivalenten Einfluss des Anteils von Zuckern auf die Bildung von HAAs: Wenn Mono- und Disaccharide im halben molaren Verhältnis zur Menge an Kreatinin und Aminosäure eingesetzt werden, wird eine maximale Ausbeute an HAAs erzielt.

An vielen wässrigen Modellsystemen konnte die fördernde Wirkung von Kohlenhydraten auf die Bildung von HAAs einerseits und dazu die Verminderung der HAA-Bildung durch höhere Kohlenhydratmengen andererseits bestätigt werden. So war bei der feinen Verteilung von wässrigen Glucose- oder Lactoselösungen auf die Oberfläche von Fleischstücken vor der Erhitzung eine Verminderung des Gehaltes an HAAs im erhitzten Produkt zu beobachten [Lit. 264]. Über die Mechanismen dieser Inhibierung ist nichts Weiteres bekannt. So wird der die HAA-Bildung inhibierende Effekt höherer Glucosekonzentrationen auf die Bildung bestimmter Maillard-Produkte, wie das direkt aus dem 3-Desoxyoson der Glucose entstehende HMF (vgl. Kapitel 1.1.1) zurückgeführt [Lit. 260]. In Modellversuchen wurde gezeigt, dass HMF an Kreatinin gebunden wird und dann nicht mehr weiterreagieren kann. Eine Reaktion zu HAAs ist damit infolge verringerter Mengen an verfügbarem Kreatinin und reduzierendem Zucker im Modellsystem nur noch in verringertem Maße möglich. Die verschiedenen Reaktionswege der Maillard-Reaktion werden dabei als konkurrierend angesehen, da andere Maillardprodukte dabei aufgrund des Zuckerüberschusses in höherem Maße entstehen und die HAA-Bildung blockieren können. Der Beweis, dass diese Annahme auch für Lebensmittel Gültigkeit besitzt, wurde noch nicht angetreten. Ebenso wurde ein bestimmter Zusatz von definierten Folgeprodukten der Maillard-Reaktion zu Modellsystemen zur Aufklärung verschiedener Reaktionswege noch nicht untersucht.

In seinen Arbeiten über den Einfluss der chemischen Zusammensetzung und der Reaktionsbedingungen auf die Bildung von HAAs in Modellsystemen und Reaktionsaromen [Lit. 69] untersuchte Goldbeck u. a. den ambivalenten Einfluss unterschiedlicher Mengen verschiedener Zucker auf die Bildung von HAAs in wasserarmen, Kreatinin und Glycin enthaltenden Modellsystemen auf Avicel-Basis.

**Abbildung 3.39**

Untersuchung der HAA-Bildung in wasserarmen Avicel-Modellsystemen (Lagerung:  $a_w = 0,75$ , 7 Tage, RT) in Abhängigkeit vom Molmengenverhältnis von Glucose zu Glycin und Kreatinin (oben) bzw. von Xylose zu Glycin und Kreatinin (unten) nach Goldbeck [Lit. 69]), Erhitzungstemperatur 120 °C für 6 h)

Wie in Abbildung 3.39 zu sehen, sind die Bildungsraten von MeIQx in erhitzten Glucose- bzw. Xylose neben Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen in gleicher Weise von dem eingesetzten Molmengenverhältnis von Zucker zu Kreatinin abhängig. Bei einem Verhältnis von Zucker zu Kreatinin zu Glycin von 0,5:1:1 ist sowohl bei dem Glucose als auch bei dem Xylose enthaltenden Modell ein Maximum der Bildung von HAAs zu beobachten. Durchweg sind im Xylose-Modell die absoluten Mengen an gebildeten HAAs geringer. Neben der Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx, die auch im Glucose-Modell gebildet werden,

konnte Goldbeck die Bildung größerer Mengen an 4,8-DiMeIQx beobachten. Das Maximum der Bildung von 7,8- bzw. 4,8-DiMeIQx ist in dem Xylose enthaltenden Modell bei einem Molmengenverhältnis von 0,5:1:1 festzustellen.

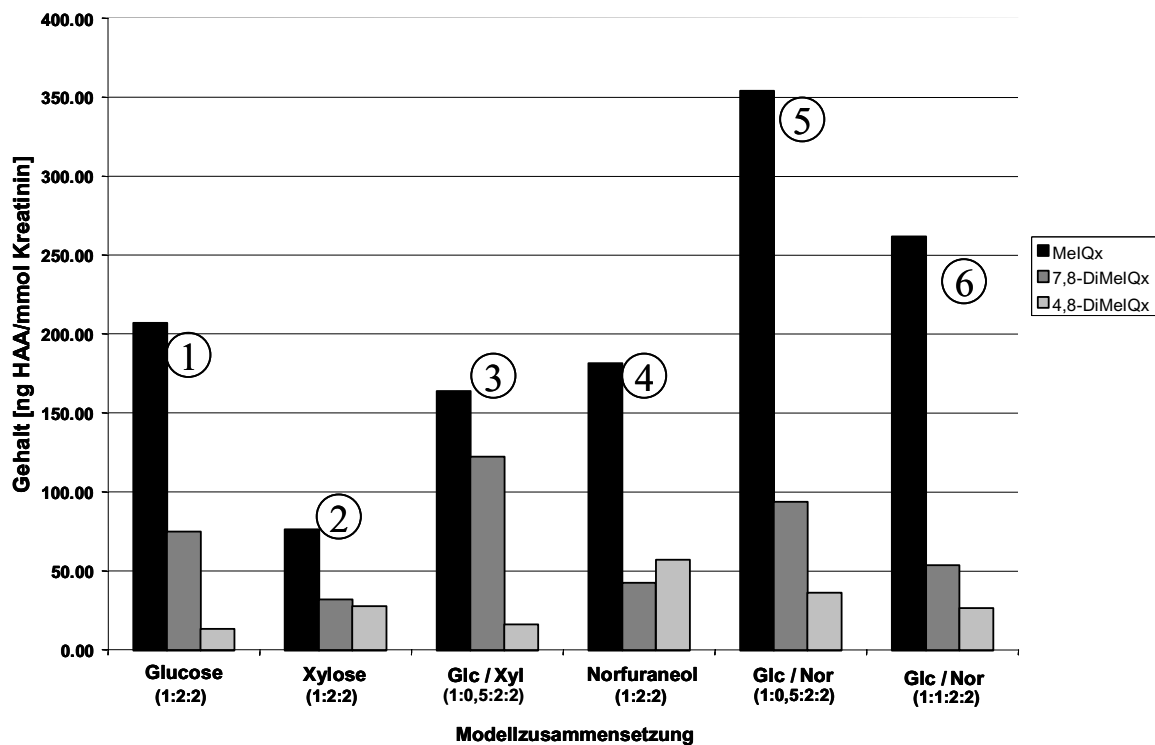
In den eigenen Arbeiten konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Wie in Abbildung 3.40 dargestellt, enthalten die eigenen Modelle neben konstanten Mengen an Glycin und Kreatinin als variable Komponenten Glucose, Xylose und Norfuraneol, das ein Folgeprodukt des über die Maillard-Reaktion gebildeten Desoxyosons der Xylose darstellt und somit als typische Zwischenstufe der Maillard-Reaktion der Xylose angesehen werden kann; deshalb wird Norfuraneol in den eigenen Versuchen als entsprechende Modellverbindung eingesetzt. Die betreffenden Modelle wurden jeweils zunächst 10 Tage bei Raumtemperatur und  $a_w = 0,75$  gelagert und anschließend 6 Stunden bei 120 °C erhitzt.

Wie aus Abbildung 3.40 hervorgeht, sind sowohl die Gesamtmengen an HAAs – im Wesentlichen MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx – als auch die Einzelmengen dieser Verbindungen in einem Xylose-Kreatinin-Glycin-Modell auf Avicel-Basis geringer als in einem entsprechenden glucosehaltigen Modell. Gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ wird MeIQx aus den Zwischenstufen 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und aus dem Strecker-Abbau von Glycin hervorgehendem Formalaldehyd, 7,8-DiMeIQx aus den Zwischenstufen 2,3,5-Trimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd gebildet. Das beim Einsatz von Xylose wider Erwarten gebildete 4,8-DiMeIQx entsteht dagegen – entsprechend der „Las-Vegas-Hypothese“ – aus 2,5-Dimethylpyrazin und durch Strecker-Abbau von Alanin gebildetem Acetaldehyd. Im Glucose-Modell ist MeIQx das in stärkstem Maße gebildete HAA neben geringeren Mengen an 7,8-DiMeIQx (75 ng/mmol Kreatinin). Im Xylose-Modell (2. Säulengruppe in Abb. 3.40) ist zwar MeIQx (76 ng/mmol Kreatinin) auch das am stärksten gebildete HAA, jedoch bilden sich im Vergleich dazu relativ große Mengen an 4,8-DiMeIQx und 7,8-DiMeIQx. Solche Mengen – im Vergleich zur Gesamtmenge der gebildeten HAAs – an 4,8-DiMeIQx sind bisher nur in Fructose-Alanin-Kreatinin-Modellsystemen auf Diethylenglykol/Wasser-Basis beobachtet worden [Lit. 71, 211].

Gemäß des Bildungspostulats von Jägerstad („Las Vegas Hypothese“, vgl. Kapitel 1.1.3) wird 4,8-DiMeIQx – wie bereits erwähnt – über Dimethylpyrazin, Kreatinin und Acetaldehyd gebildet. In den eigenen Modellsystemen wurde jedoch nur Glycin verwendet. Wenn die Bildung also nach dem allgemein gültigen Bildungspostulat von Jägerstad ablaufen soll, muss es eine andere Quelle für Acetaldehyd als den Strecker-Abbau geben. Es ist bekannt, dass aus der Retroaldolkondensation der im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten

1-Desoxy-2,3-diulosen im alkalischen Milieu Essigsäure entstehen kann. Diese könnte von Maillard-Produkten mit Reduktoncharakter dann zum Acetaldehyd reduziert werden. Dies wurde in der Literatur bisher aber noch nicht eingehend beschrieben.

Negishi et al. [Lit. 208] isolierten aus einem Glucose, L-Threonin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem auf Diethylenglykol/Wasser-Basis sowohl MeIQx als auch 4,8-DiMeIQx. Sie führten dies auf eine Spaltung von L-Threonin in Alanin und Glycin zurück. Diese Spaltung ist in der Natur unter Enzymkatalyse durch Threonin-Aldolase von Lees und Jago [Lit. 158] beobachtet worden.



**Abbildung 3.40**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Glucose (Glc), Xylose (Xyl); Norfuraneol (Nor) = variable Komponenten;

Glycin, Kreatin = nicht variable Komponenten

Klammer-Termini = Säulengruppen 1,2 und 4:

molare Verhältnisse von Glc/Xyl/Nor:Glycin:Kreatinin

Säulengruppe 3:

molare Verhältnisse von Glc:Xyl:Glycin:Kreatinin

Säulengruppe 5 und 6:

molare Verhältnisse von Glc:Nor:Glycin:Kreatinin

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu$ m); Gradientenelution mit TEAP-Puffer-CH<sub>3</sub>CN

Wie aus Abbildung 3.40 hervorgeht, ist in dem neben Glycin und Kreatinin Xylose enthaltenen Modell (2. Säulengruppe) die Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx gegenüber dem entsprechenden Glucose enthaltenden Modell (1. Säulengruppe) vermindert, während 4,8-DiMeIQx in stärkerem Maße gebildet wird. Betrachtet man die HAA-Bildung eines Norfuraneol-Glycin-Kreatinin-Modellsystems, so lässt sich eine geringfügig verminderte Bildung

von MeIQx gegenüber dem parallel untersuchten, Glucose enthaltenden Modell beobachten, obwohl eigentlich eine geringere Menge an gebildetem MeIQx zu erwarten wäre, wenn man für Norfuraneol als ein Hauptabbauprodukt des 1-Desoxyosons der Xylose Analogien zu dem Xylose enthaltenden Modell zieht. Dass Analogien bestehen, ist zu vermuten, da auch hier, wie bei der Anwesenheit von Xylose als Reaktionspartner, verstärkt 4,8-DiMeIQx gebildet wird. Die Bildung von 4,8-DiMeIQx aus Modellsystemen, die lediglich Glycin als Aminosäurekomponente enthalten, steht im Widerspruch zur „Las-Vegas-Hypothese“, nach der für die Bildung von 4,8-DiMeIQx Alanin bzw. der aus dieser Aminosäure entstehende im Rahmen des Streckerabbaus entstehende Acetaldehyd vorliegen muss.

Exemplarisch soll an dieser Stelle im Vorgriff auf die so genannten Zweikomponenten-Modellsysteme (vgl. Kapitel 3.8) gezeigt werden, inwieweit sich ein Zusatz von Xylose bzw. Norfuraneol zu Glucose-Glycin-Kreatinin-Modellsystemen auf die Menge der gebildeten HAAs auswirkt (siehe Säulengruppe 3, 5 und 6 in Abb. 3.40). Es ist zu erkennen, dass hierbei deutlich zwischen einem Xylose- und einem Norfuraneol-Zusatz unterschieden werden kann. Bevor komplexe Zweikomponentensysteme untersucht werden, sollte man daher zunächst den Einfluss unterschiedlicher Molmengenverhältnisse ausgewählter Abbauprodukte der Xylose zu Kreatinin in Einkomponentensystemen betrachten. Bei dem Modell, das Glucose, Xylose, Glycin und Kreatinin im Verhältnis 1:0,5:2:2 enthält, ist der Gehalt an Monosacchariden insgesamt erhöht und befindet sich oberhalb des Optimums für die HAA-Bildung. In Kenntnis der Abhängigkeit der Bildungsrate von den Molmengenverhältnissen in Xylose- und Glucose-Modellen, ist es einfach, eine verminderte Bildung von HAAs abzuleiten. Betrachtet man jedoch die HAA-Bildung in einem Glucose-Norfuraneol-Glycin-Kreatinin-Modell (Molmengenverhältnisse 1:0,5:2:2), so sind neben 4,8-DiMeIQx und 7,8-DiMeIQx Kreatinin erhebliche Mengen an MeIQx feststellbar. Erhöht man den Anteil an Norfuraneol, so werden allerdings wieder geringere Mengen der drei HAAs gebildet (Säulengruppe 6 im Vergleich zu Säulengruppe 5).

In seinen Arbeiten zum Einfluss von Zwischenprodukten der Maillard-Reaktion auf die Bildungsrate von HAAs in wasserarmen Modellsystemen stellte Schuirmann [Lit. 246] zunächst ein Avicel-Modellsystem mit Fructose und Glycin, jedoch ohne Kreatinin, her, sodass die Bildung von HAAs praktisch ausgeschlossen und eine von anderen Komponenten nicht beeinflusste Bildung von Maillard-Zwischenprodukten gewährleistet war. Er erhitzte dieses Modellsystem 90 min bei 70 °C, um im Reaktionsgemisch eine möglichst hohe Ausbeute an Maillard-Zwischenprodukten zu bekommen. Das so vorbehandelte Modell wurde anschließend mit einer wässrigen Kreatininlösung versetzt und nach Gefriertrocknung und Anglei-



chung an eine bestimmte Wasseraktivität zwei Stunden lang auf 120 °C erhitzt. Bei der Bestimmung der gebildeten Mengen von HAAs stellte er fest, dass durch Austausch von Zuckern gegen eine entsprechende molare Menge an Maillard-Zwischenprodukten eine verstärkte Bildung von HAAs zu beobachten ist. Demzufolge müsste dies auch bei den Norfuraneol enthaltenden Modellen der Fall sein. Dies kann nach unseren Untersuchungen jedoch nur für Modelle bestätigt werden, die sowohl Norfuraneol als auch Glucose enthalten. Da in derartigen Reaktionsmischungen auch Folgeprodukte von Desoxyosonen wie HMF und Furaneol entstehen, können diese zusätzlich in die Bildungsreaktion von HAAs eingehen. Norfuraneol stellt – wie bereits erwähnt – neben Furfural auch ein wichtiges Abbauprodukt von Desoxyosonen der Pentosen dar und entsteht deshalb in größeren Mengen.

Abbildung 3.40 zeigt, dass in Anwesenheit einer für die HAA-Bildung optimalen Glucosemenge und der halben molaren Menge an Norfuraneol die Bildung von HAAs, insbesondere von MeIQx, gegenüber dem (neben Glycin und Kreatinin) nur Glucose enthaltenden Modell deutlich gefördert wird. Erst bei höherem Norfuraneol-Zusatz werden dann aufgrund der damit erhöhten Gesamtmenge an Kohlenhydraten geringere Mengen an HAAs gebildet.

Der konkrete Einfluss von Norfuraneol und anderer Maillard-Zwischenprodukte auf den Bildungsweg der HAAs ist noch nicht geklärt. Außerdem gibt es – wie bereits beschrieben – keine zufrieden stellende Absicherung der These, dass bei erhöhtem Angebot an Zuckerkomponenten die fortschreitende Maillard-Reaktion, z. B. durch direkte Reaktion von Zuckerabbauprodukten mit Kreatinin, in direkter Konkurrenz zur HAA-Bildung steht. Deshalb kann man aus derartigen Modellen, bei denen die qualitative Modellzusammensetzung und die Molmengenverhältnisse der Reaktanden – also zwei Parameter variieren – keine gesicherten Aussagen treffen.

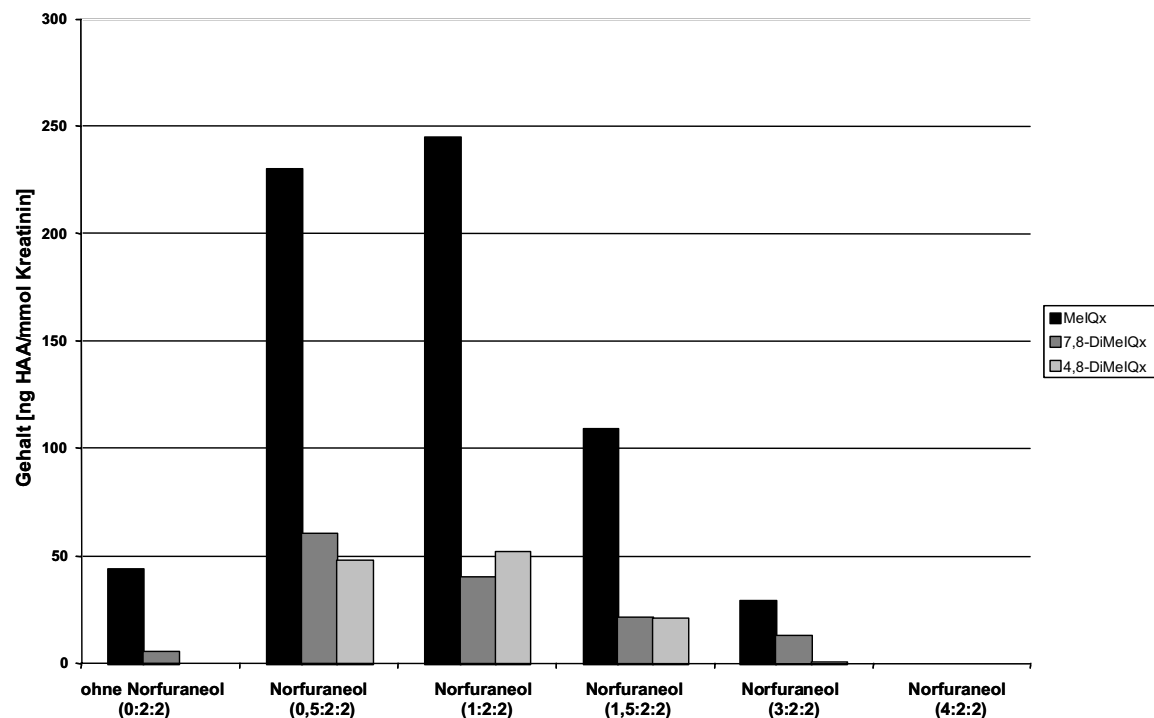
In den eigenen Arbeiten wurden daher zunächst Modelle untersucht, bei denen Abbauprodukte von Pentosen die alleinigen Carbonylkomponenten im Sinne des allgemein anerkannten HAA-Bildungspostulats von Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) darstellen. Dabei wurden jeweils definierte Molmengenverhältnisse in Bezug auf die im äquimolaren Verhältnis zueinander vorliegenden Verbindungen Glycin und Kreatinin für zwei unterschiedliche Abbauprodukte von Pentosen gewählt.

Für systematische Untersuchungen werden zum einen Norfuraneol enthaltende wasserarme Modelle auf Avicel-Basis eingesetzt. Norfuraneol entsteht, wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben, als Abbauprodukt des 1-Desoxyosons von Pentosen. Norfuraneol ist mit einem Aroma nach gerösteter Zichorie eine zentrale Aromakomponente von Fleischbrühe.

Zum anderen wird als Carbonylkomponente Methylglyoxal (2-Oxopropanal) eingesetzt. Es entsteht aus der Retroaldolkondensation von 3-Desoxy-1,2-dicarbonylverbindungen, also auch beim Abbau des 3-Desoxyosons der Glucose und der Xylose. Auch Methylglyoxal ist maßgeblich an der Bildung der Aromakomponenten von gebratenem Fleisch beteiligt. Die Bildung dieser Verbindung ist auch nach Wasserabspaltung aus Dihydroxyaceton denkbar.

### 3.6.2 Einfluss von Norfuraneol als Kohlenhydratkomponente auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen

Um die im vorangegangenen Kapitel erörterte Rolle von Norfuraneol bei der HAA-Bildung näher zu beleuchten, wurde in weiteren Modellversuchen Norfuraneol als einzige Kohlenhydratkomponente in wechselnden Mengenanteilen eingesetzt.



**Abbildung 3.41**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w=0,75$ , 10d; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Norfuraneol = variable Komponente;

Glycin und Kreatinin = konstant bleibende Komponenten

Klammer-Termini = molare Verhältnisse von Norfuraneol:Glycin:Kreatinin

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu\text{m}$ ); Gradientenelution mit TEAP-Puffer- $\text{CH}_3\text{CN}$

Auch beim Einsatz von Norfuraneol neben Glycin und Kreatinin in Avicel-Modellsystemen liegt, wie aus Abbildung 3.41 ersichtlich, das Maximum der Bildung von MeIQx bei einem halbmolaren Verhältnis von Norfuraneol zu Glycin und Kreatinin. Die Modelle wurden jeweils 10 Tage bei  $a_w = 0,75$  gelagert und anschließend 6 Stunden bei 120 °C erhitzt.

Verläuft die Bildung nach dem allgemeingültigen Bildungspostulat nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3), so müssen Pyridin- oder Pyrazinderivate an der Bildungsreaktion beteiligt sein. Die Entstehung von flüchtigen Abbauprodukten wie Pyrrolen oder Pyrazinen unter Beteiligung von Norfuraneol ist jedoch bisher noch nicht beschrieben worden. Betrachtet man die Abbildung, so fällt auf, dass bereits ohne Zusatz von Norfuraneol MeIQx und geringe Mengen an 7,8-DiMeIQx entstehen. Die Bildung dieser HAAs könnte über einen alternativen Bildungsweg verlaufen, da zwar Aldehyde nach oxidativer Desaminierung und Decarboxylierung (vgl. Kapitel 3.1.2) aus Aminosäuren entstehen können, Norfuraneol jedoch nicht als Kohlenhydratkomponente im Rahmen des Streckerabbaus fungieren kann und somit auf diesem Wege keine Pyrazine gebildet werden können. Norfuraneol geht stattdessen mit weiteren Zwischenstufen der Maillard-Reaktion bevorzugt Kondensationsreaktionen ein, die dann zu niedermolekularen Bräunungsprodukten führen (vgl. Kapitel 1.1.1.2). Es ist nicht zu vermuten, dass Aminosäure bzw. Aminosäurefragmente, die dann durch Kondensation untereinander Pyrazine bilden können, und Acetaldehyd als Spaltprodukte bei diesen Kondensationsreaktionen entstehen können, die dann gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ mit Kreatinin zu 4,8-DiMeIQx reagieren könnten. Ein Beweis hierfür kann nicht erbracht werden.

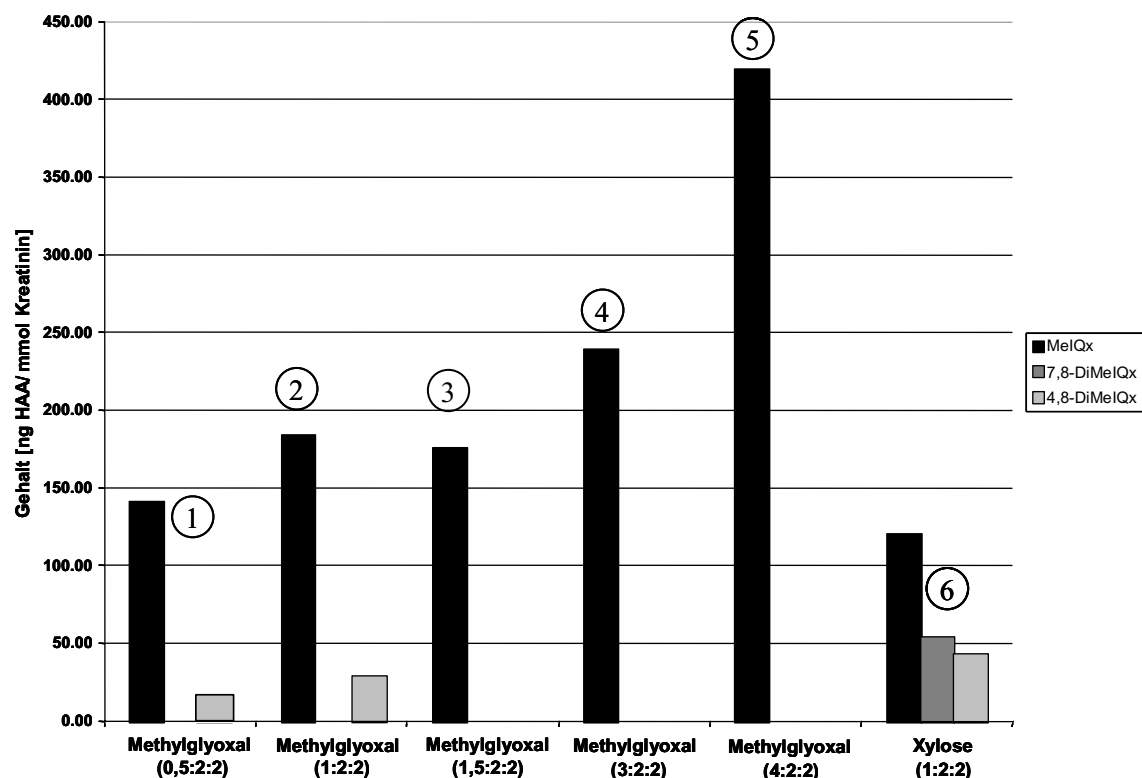
Weiter fällt auf, dass die Bildung von HAAs mit steigendem Molmengenverhältnis von Norfuraneol zu Glycin und Kreatinin rasch abnimmt. Daher ist anzunehmen, dass bei der erhöhten Norfuraneol-Konzentration vermehrt die oben genannten Kondensationsreaktionen stattfinden.

### **3.6.3 Einfluss von Methylglyoxal als Carbonylkomponente auf die Bildungsrate von HAAs in Avicel-Modellsystemen**

Erhitzt man Methylglyoxal, Glycin und Kreatinin enthaltende Modellsysteme, die 10 Tage bei  $a_w = 0,75$  gelagert wurden, 6 Stunden auf 125 °C, so zeigt sich bei steigenden Molmengenverhältnissen von Methylglyoxal zu Glycin – wie aus der Abbildung 3.42 hervorgeht – ein Anstieg der gebildeten Menge an HAAs insbesondere an MeIQx.

Demnach besteht also kein ambivalenter Einfluss wie im Falle von reduzierenden Zuckern. Es konnte in diesem Fall nur MeIQx in größeren Mengen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.42). Parallel dazu durchgeführte HPLC-MS/MS-Bestimmungen zeigen, dass sich 4,8- und 7,8-DiMeIQx meist nur in Spuren bilden. Nur bei einem Methylglyoxal-Molmengenverhältnis von 0,5:2:2 und 1:2:2 in Bezug auf die beiden anderen Modellkomponenten kann mittels HPLC-DAD eine geringe Menge 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden.

Durchweg lagen jedoch die mittels HPLC-DAD bestimmten Mengen an MeIQx über denen eines parallel angesetzten Xylose-Glycin-Kreatinin-Modells (vgl. Abb. 3.42, 6. Säulengruppe).



**Abbildung 3.42**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage, 125 °C, 6 h)  
 Modellzusammensetzung: Methylglyoxal (1 - 5. Säulengruppen), Xylose (6. Säulengruppe)

= variable Komponente;

Klammer-Termini = molare Verhältnisse von Methylglyoxal:Glycin:Kreatinin

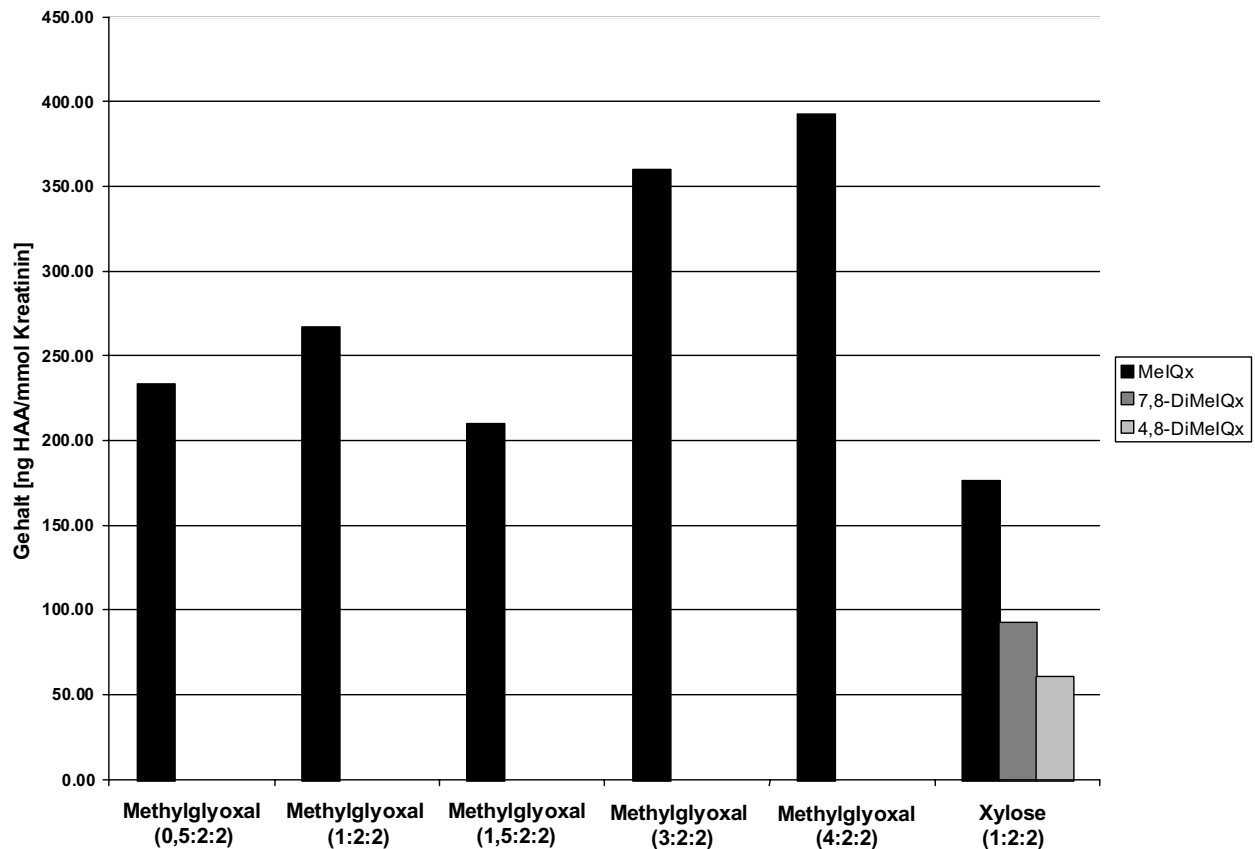
Bestimmung : über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu\text{m}$ ), Gradientenelution  
 TEAP-Puffer- $\text{CH}_3\text{CN}$

Die gegenüber diesem Modell verstärkte Bildung von MeIQx in dem Methylglyoxal enthaltendem Modell ist darauf zurückzuführen, dass Methylglyoxal aufgrund seiner  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur Aminosäuren in einer Strecker-Reaktion unter oxidativer Decarboxylierung der Aminosäuren direkt zu Streckeraldehyden,  $\text{CO}_2$  und  $\alpha$ -Aminoketonen umsetzen kann. Zwei dieser Aminoketone können dann zu einem Pyrazin-Derivat kondensieren.

Höhere Mengen an Strecker-Aldehyden und Pyrazinen führen in Anwesenheit genügender Mengen an Kreatinin zu einer verstärkten Bildung von HAAs, da sie gemäß des Bildungspostulats nach Jägerstad entscheidend an der Bildung von HAAs beteiligt sind. Im vorliegenden Fall entsteht gemäß des Bildungspostulats von Jägerstad vorwiegend MeIQx.

Wie Abbildung 3.43 zeigt, steigt die Bildungsrate von MeIQx in den Methylglyoxal enthaltenden Modellsystemen auch bei einer Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung (vgl. Kapitel 3.2.4) für 1 h bei 150 °C mit zunehmenden Mengen an Methylglyoxal. Die gebildeten

Mengen an MeIQx sind zum Teil um etwa 35 % bis 40 % höher als bei den in Abbildung 3.42 gezeigten Modellversuchen.



**Abbildung 3.43**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 1 h)  
 Modellzusammensetzung: Methylglyoxal (1 - 5. Säulengruppen), Xylose (6. Säulengruppe)

= variable Komponente;

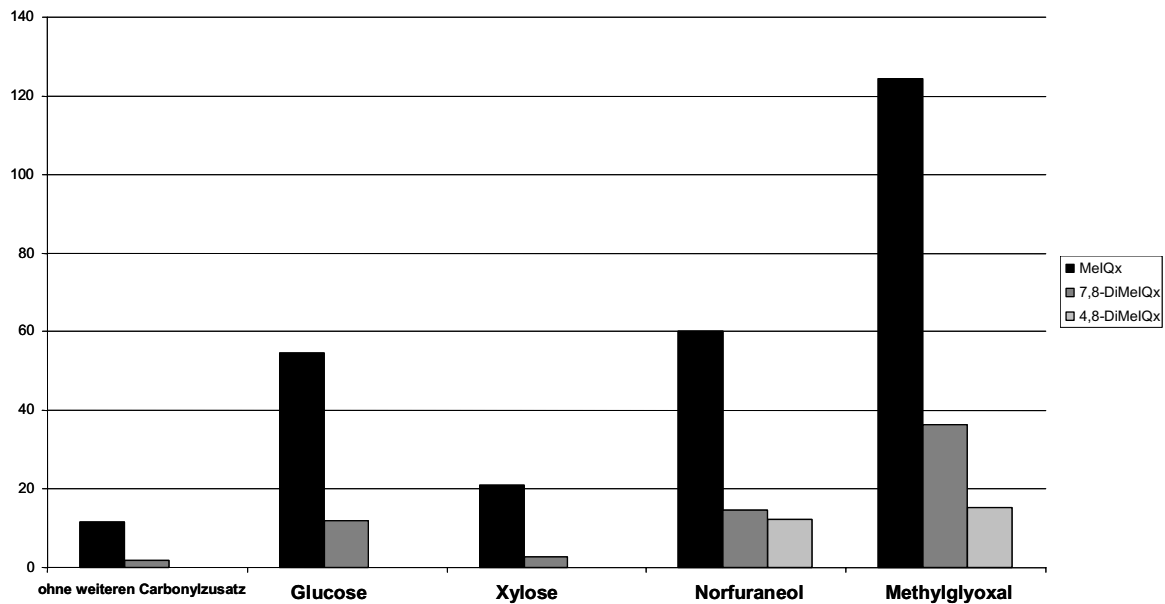
Klammer-Termini = molare Verhältnisse von Methylglyoxal:Glycin:Kreatinin

Bestimmung : über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4 µm), Gradientenelution  
 TEAP-Puffer-CH<sub>3</sub>CN

### 3.6.4 Einfluss der Temperatur auf die Bildungsrate von HAAs bei Xylose und Xyloseabbauprodukte enthaltenden Modellsystemen

Neben der Zusammensetzung beeinflusst die Temperatur maßgeblich die Bildungsrate der HAAs. Für nur Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltende Modelle ist bekannt, dass mit einer Temperaturerhöhung im Bereich zwischen 100 °C bis 150 °C ein fast exponentieller Anstieg an MeIQx einhergeht [Lit. 246]. Für die beiden Carbonyle Fructose und Glucose wurden keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Reaktionsverhaltens festgestellt. Es war nun von Interesse, wie sich Änderungen der Erhitzungstemperatur auf die Geschwindigkeit der HAA-Bildung in Modellsystemen auswirken, die unterschiedlich schnell zu einem weiten

Spektrum von Maillard-Folgeprodukten weiterreagierende Zuckerabbauprodukte (Norfuraneol, Methylglyoxal) enthalten.



**Abbildung 3.44**

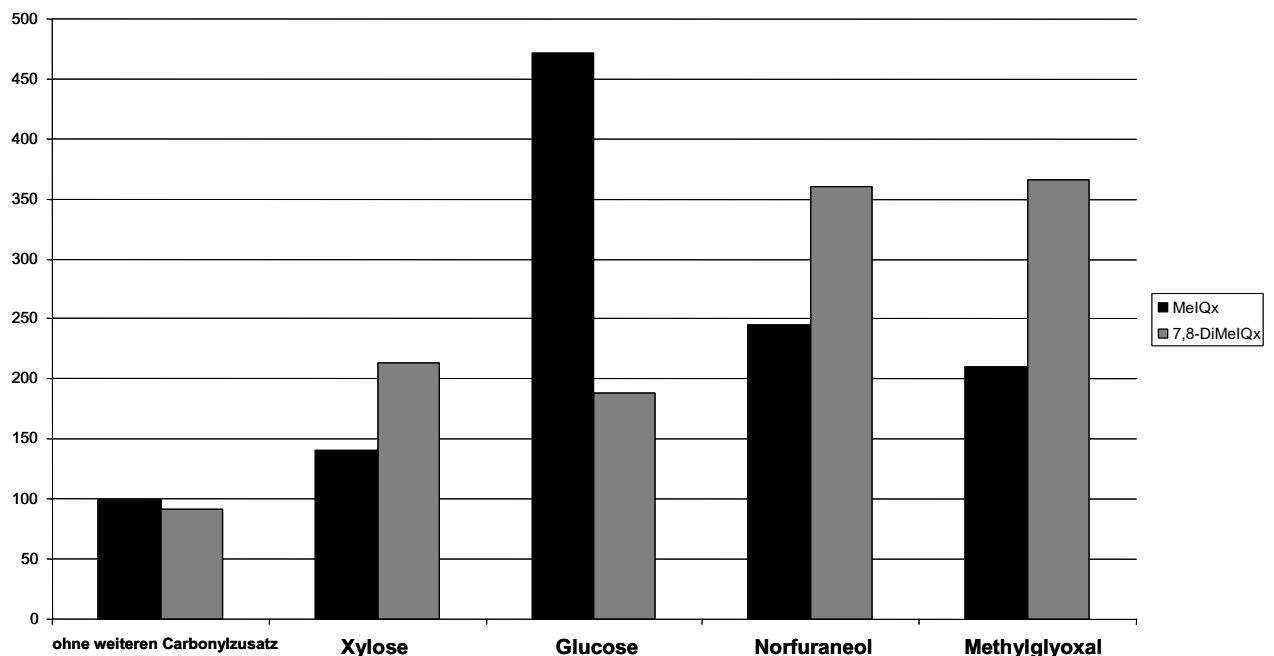
Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 100 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose, Xylose, Norfuraneol, Methylglyoxal

Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponente : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )



**Abbildung 3.45**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 180 °C, 1 h)

Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Xylose, Glucose, Norfuraneol, Methylglyoxal

Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponente : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Wie in den Abbildungen 3.44 und 3.45 zu sehen, wurden beispielhaft Avicel-Modellsysteme, die neben Glycin und Kreatinin eine weitere Carbonylkomponente im für die HAA-Bildung optimalen Verhältnis von 2:2:1, zum einen bei 100 °C für 6 h (Abb. 3.44) und zum anderen bei 180 °C für 1 h (Abb. 3.45) erhitzt (Herstellung vgl. Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.5.3, Lagerung vgl. Kapitel 6.6, Erhitzung vgl. Kapitel 6.7.1).

Bei einer verminderten Erhitzungstemperatur von 100 °C wird, wie aus Abbildung 3.44 ersichtlich, auch ohne Zusatz einer Carbonylkomponente MeIQx und 7,8-DiMeIQx in geringen Mengen gebildet. Diese Bildung muss, wie zuvor schon erwähnt über einen alternativen Bildungsweg verlaufen, der mithilfe der „Las-Vegas-Hypothese“ (vgl. Kapitel 1.1.2) nicht erklärt werden kann. Bei vermindelter Temperatur reduziert sich der Gehalt an gebildeten HAAs. Bei den Glucose und Xylose enthaltenden Modellsystemen hat sich im Vergleich zu einem identisch zusammengesetzten und gelagerten Modellsystem, das jedoch bei 120 °C für 6 h erhitzt wurde (siehe Abb. 3.40, Säulengruppe 1 und 2) die Menge an gebildeten MeIQx um den Faktor 4 reduziert. Die Bildung von 7,8-DiMeIQx besonders bei dem Xylose-haltigen Modellsystem geht noch stärker zurück; eine Bildung von 4,8-DiMeIQx kann auch unter Zuhilfenahme der HPLC-MS/MS nicht festgestellt werden. Die Bildung von MeIQx ist in dem Norfuranol enthaltenden Modell im Vergleich zu der um 20 °C höheren Erhitzungstemperatur um den Faktor 3 (vgl. Abb. 3.40, Säulengruppe 4), die Bildung von MeIQx in dem Methylglyoxal enthaltenden Modell um den Faktor 2 geringer (vgl. Abb. 3.42, Säulengruppe 2). Da beim Norfuranol enthaltenden Modell die gebildete Menge von 4,8-DiMeIQx, die bei höheren Erhitzungstemperaturen üblicherweise immer über der von 7,8-DiMeIQx liegt, deutlich vermindert ist, ist zu vermuten, dass für die Bildung von 4,8-DiMeIQx, dessen Bildung nach der „Las-Vegas-Hypothese“ aus den in Rede stehenden Modellsystemen nicht zu erklären ist, über einen Bildungsweg verläuft, der bei niedriger Erhitzungstemperatur weniger bevorzugt ist. Bei dem Methylglyoxal enthaltenden Modellsystem kann die Bildung von 4,8- und 7,8-DiMeIQx beobachtet werden, die hingegen bei 125 °C und 150 °C Erhitzungstemperatur nicht zu beobachten ist (vgl. Abb. 3.42 und 3.43). Auch hier ist die Bildung dieser beiden HAAs über einen weiteren alternativen Bildungsweg zu vermuten, der jedoch in Bezug auf Methylglyoxal als Carbonylkomponente ausschließlich bei vermindelter Erhitzungstemperatur Bedeutung erlangt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass beim Einsatz von Carbonylkomponenten wie Norfuranol und Methylglyoxal, die allgemein mit einer höheren Reaktivität gegenüber Zuckern belegt werden, der temperaturabhängige Rückgang der HAA-Bildung, im Wesentlichen der Rückgang der Menge an gebildetem MeIQx, gegenüber Glucose und Xylose enthaltenden

Modellsystemen geringer ist. Daher ist davon auszugehen, dass Norfuraneol und Methylglyoxal bei niedrigeren Temperaturen aufgrund der höheren Reaktivität mehr für die HAA-Bildung notwendige Vorstufen bilden können.

Betrachtet man die Bildungsrate von MeIQx und 7,8-DiMeIQx bei Modellsystemen, die bei 180 °C erhitzt wurden, so zeigt sich, wie aus in Abbildung 3.45 ersichtlich, dass neben der generell erhöhten Menge an gebildetem MeIQx die Menge an gebildetem 7,8-DiMeIQx im Vergleich zu bereits untersuchten Modellsystemen deutlich zunimmt, die bei 120 °C bzw. 150 °C erhitzt wurden. Da bei einem Modellsystem, das neben Glycin und Kreatinin keine weiteren Komponenten enthält, nach entsprechender Erhitzung von 180 °C für 1 h bereits etwa 100 ng MeIQx und 85 ng 7,8-DiMeIQx pro mmol Kreatinin nachweisbar sind, sind die aus Hochtemperaturerhitzungen abgeleiteten Erkenntnisse stets kritisch zu betrachten, da die bisherigen Erklärungsansätze zur Bildung von HAAs aus Modellen abgeleitet wurden, die bei geringer Temperatur erhitzt wurden. Bei den Glucose enthaltenden Modellsystemen sind keine grundsätzlichen Auffälligkeiten zu beobachten. Jedoch fällt beim Einsatz von Xylose oder Norfuraneol bzw. Methylglyoxal, die als charakteristische Abbauprodukte der Xylose zu sehen sind, als Modellkomponenten neben Glycin und Kreatinin, wie in Abbildung 3.45 zu sehen, eine verstärkte Bildung von 7,8-DiMeIQx bei Erhöhung der Erhitzungstemperatur auf 180 °C auf. Die gebildete Menge an 7,8-DiMeIQx liegt dabei deutlich über der gebildeten Menge an MeIQx.

Darüber hinaus ist eine verstärkte Bildung von 7,8-DiMeIQx gegenüber einem Modellsystem, welches bis auf den Zusatz von Methylglyoxal als Carbonylkomponente und einer Erhitzung für eine Stunde auf 150 °C gleich zusammengesetzt ist (vgl. Abb. 3.43), auffällig, die bei 150 °C gänzlich unterdrückt ist. Es ist zu vermuten, dass abhängig von der Erhitzungstemperatur unterschiedliche Reaktionen zur Bildung der HAAs führen, da ansonsten oben genanntes Bildungsverhalten nicht erklärt werden kann. In vielen Untersuchungen wird das Maß der HAA-Bildung häufig an MeIQx als Marker für alle HAAs festgemacht.

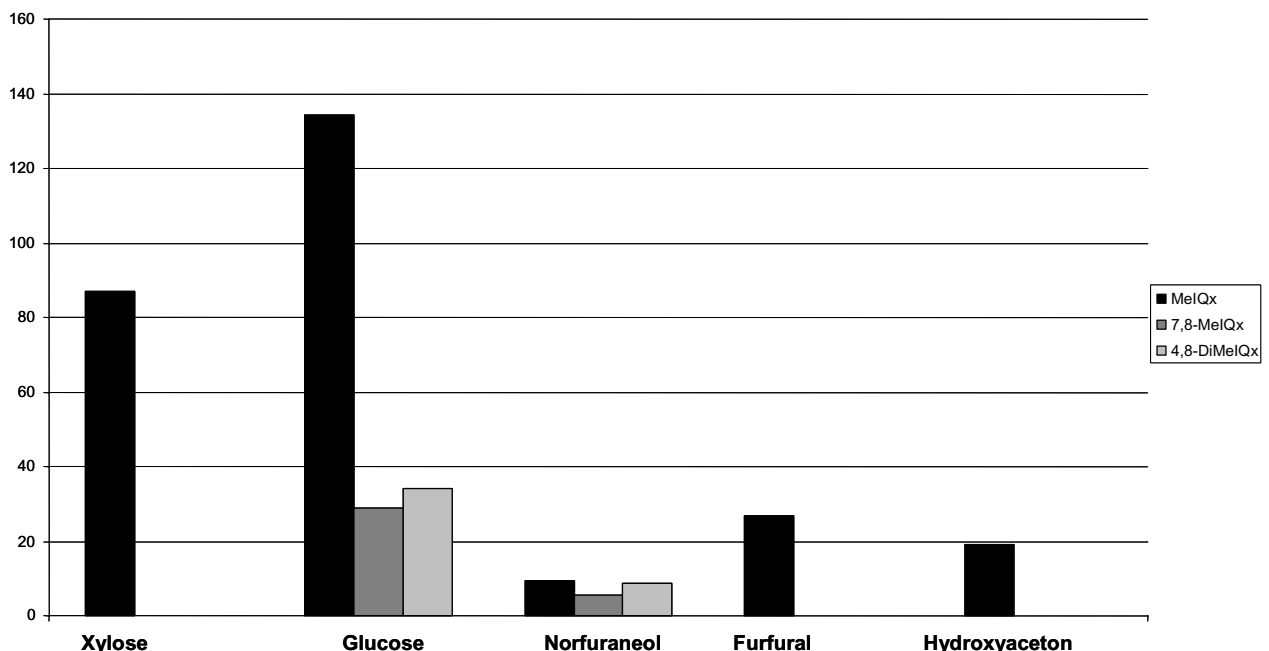
### **3.7 Bildung von HAAs in Einkomponentensystemen mit Alanin als Aminosäurekomponente**

Johannsson et al. [Lit. 117] konnten im Rahmen einer Forschungsarbeit zum Einfluss von verschiedenen Aminosäuren auf die Bildung von HAAs in Modellsystemen zeigen, dass IQx, MeIQx, und 7,8-DiMeIQx von fast allen Aminosäuren, darunter auch Alanin gebildet werden.



Ausgehend vom Bildungspostulat nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) ist Glycin ein Precursor für IQ, MeIQx und 7,8-DiMeIQx. Dies erklärt die gegenüber dieser Versuchsreihe verstärkte Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx in entsprechenden Glycin statt Alanin enthaltenden Modellsystemen (vgl. Abbildung 3.43). Alanin müsste dementsprechend für die Bildung von MeIQ und 4,8-DiMeIQx, nicht aber für die Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx in Modellsystemen verantwortlich sein. Jägerstad äußert in ihren Arbeiten [Lit. 120] die Vermutung, dass Glycin auch durch eine Retro-Aldolkondensation von Aminosäuren entstehen kann oder MeIQx und 7,8-DiMeIQx über einen nicht näher definierten radikal-induzierten Abbau gebildet werden.

Um den Einfluss von Alanin auf die HAA-Bildung zu untersuchen, wurden Avicel-Modellsysteme, die neben Alanin und Kreatinin jeweils noch eine weitere Carbonylkomponente im molaren Verhältnis von 2:2:1 enthalten, 10 Tage bei  $a_w = 0,75$  gelagert und anschließend 6 h bei 120 °C erhitzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.46 dargestellt. Beim Vergleich mit Glycin statt Alanin enthaltenden Modellsystemen (vgl. Abb. 3.43) fällt auf, dass sich die Menge an gebildetem MeIQx mit Glucose bzw. Xylose als Carbonylkomponente durch Austausch der Aminosäure nicht signifikant ändert. In Glucose-Alanin-Kreatinin-Modellsystem ist bei der Verwendung von Alanin eine verstärkte Bildung von 4,8-DiMeIQx im Vergleich zum Glycin enthaltenden Modell zu beobachten.



**Abbildung 3.46**

Bildung von HAAs in alanin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Alanin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Xylose, Glucose, Norfuraneol, Furfural, Hydroxyacetone

Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponente : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Dagegen ist im Xylose-Alanin-Kreatinin-Modellsystem (Abb. 3.46) neben MeIQx kein weiteres HAA gebildet worden. Dies ist ungewöhnlich, da in allen bisher untersuchten Xylose enthaltenden Avicel-Modellsystemen neben MeIQx auch noch 4,8- und 7,8-DiMeIQx nachgewiesen werden konnten. Die gebildeten Mengen an HAAs in Avicel-Modellsystemen, die neben Alanin und Kreatinin noch Norfuraneol, Furfural oder Hydroxyaceton enthalten, sind zu gering um gesicherte Aussagen machen zu können.

Die Verwendung von Alanin anstatt Glycin in den untersuchten Modellansätzen zeigt wiederum, dass die Bildung von HAAs in wasserarmen Modellsystemen nicht ausschließlich über das Bildungspostulat nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) erklärt werden kann.

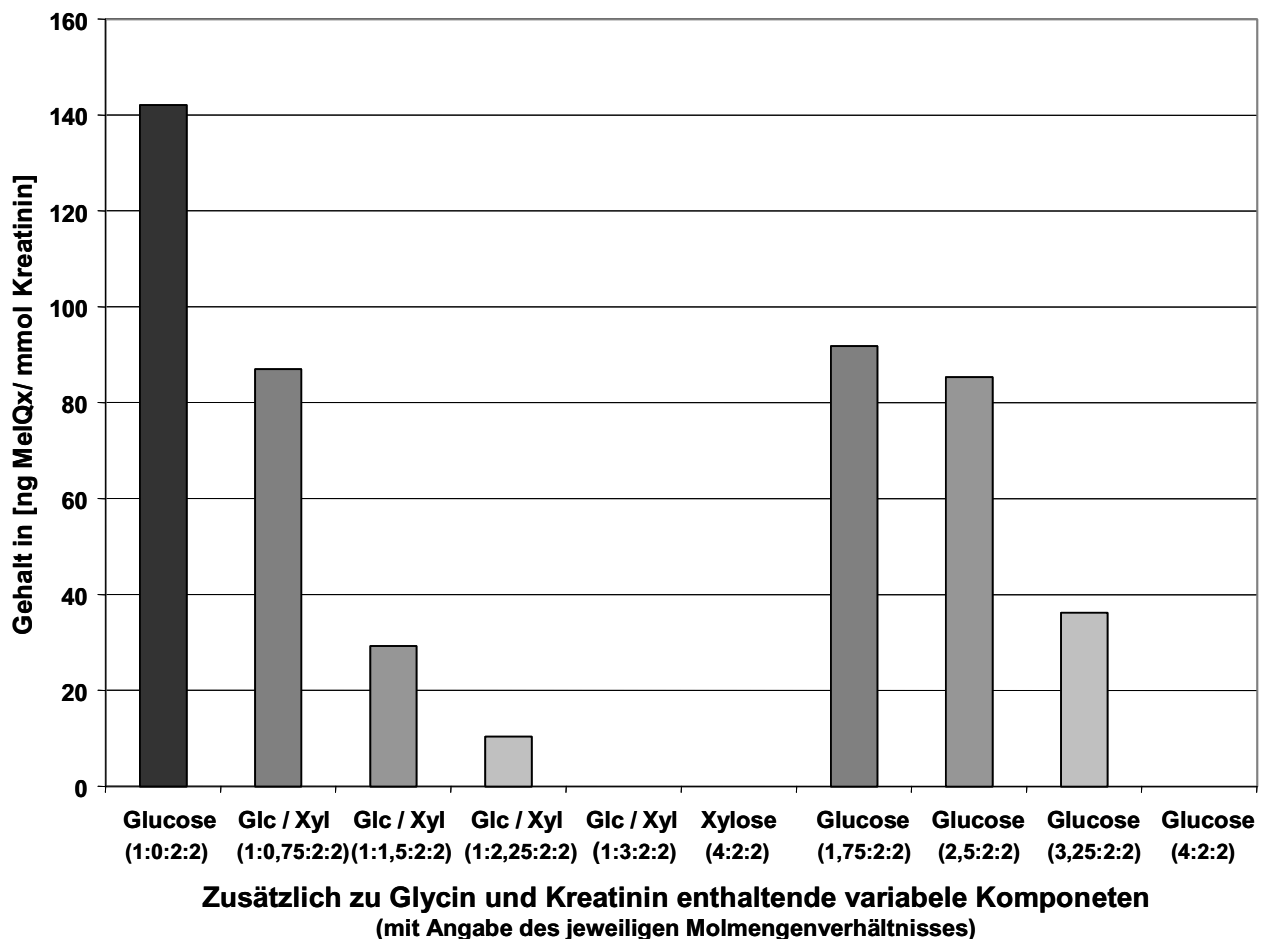
### **3.8 Bildung von HAAs in Zweikomponentensystemen**

Bei den in den eigenen Arbeiten untersuchten so genannten Zweikomponentensystemen handelt es sich um wasserarme Avicel-Modellsysteme, die neben der Trägermatrix Avicel, den wesentlichen Modellbestandteilen Kreatinin und Glycin noch einen aus 2 Komponenten bestehenden Carbonylbestandteil enthalten. Dieser Carbonylbestandteil besteht aus Glucose und einer weiteren Carbonylkomponente (vgl. Auswahl der Carbonylkomponenten in Kapitel 3.2). Zum einen wird bei den in diesem Kapitel zusammengefassten Modellansätzen aus Gründen der Vergleichbarkeit neben Kreatinin und Glycin nur Glucose bzw. nur die weitere Carbonylkomponente. Zum anderen wird neben Kreatinin und Glycin eine Mischung aus der weiteren Carbonylkomponente und Glucose als Carbonylbestandteil eingesetzt.

Ziel der Versuchsführung ist, den Einfluss einer Mischung einer weiteren Carbonylkomponente mit Glucose auf die Bildungsrate der HAAs zu ermitteln. Aus dieser Art von Modellsystemen können z. B. ansatzweise Rückschlüsse auf neben Kreatinin und Glycin auch noch verschiedene Kohlenhydrate enthaltende Lebensmittel geschlossen werden. Insbesondere in Lebensmitteln auf Fleischbasis lassen sich neben größeren Mengen an Proteinen, freien Aminosäuren und Kreatin bzw. Kreatinin Hexosen, meist Glucose und auch Pentosen nachweisen. Häufig wird Xylose bei der Herstellung von Fleischreaktionsaromen eingesetzt. Um die zur Bildung von HAAs führenden Reaktionen in solchen komplex zusammengesetzten Lebensmitteln näher beleuchten zu können, sollen als Carbonylkomponenten auch noch herstellungsbedingt im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildete Abbauprodukte von Pentosen, insbesondere von Xylose, eingesetzt werden.

### 3.8.1 Untersuchungen an Modellsystemen mit zwei Zuckerkomponenten

Ein einfaches Zweikomponentensystem kann dergestalt aufgebaut sein, dass neben einer Grundzusammensetzung jeweils eine weitere Komponente in unterschiedlichen Mengen hinzugefügt wird. In den eigenen Arbeiten wurde, wie in Abbildung 3.47 zu sehen, zunächst ein Modell auf Avicel-Basis mit der Grundzusammensetzung Glucose, Glycin, und Kreatinin im Molmengenverhältnis 1:2:2 verwendet; dazu wurden unterschiedliche Mengen – jeweils in definiertem Molmengenverhältnis zu den übrigen Komponenten – an Xylose hinzugefügt. Um einen direkten Vergleich zum alleinigen Einsatz von Glucose durchführen zu können, wurden zusätzlich auch noch Glucose-Glycin-Kreatinin-Modelle hergestellt, bei denen die Molmengen an Glucose im Verhältnis zu den anderen Komponenten so gewählt wurden,



**Abbildung 3.47**

Bildung von MeIQx in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Glucose, Xylose = variable Komponenten, wie angegeben;

Glycin, Kreatinin = nicht-variable Komponenten

Klammer-Termini = molare Verhältnisse von Glucose:Xylose:Glycin:Kreatinin bzw.

molare Verhältnisse von Xylose:Glycin:Kreatinin bzw.

molare Verhältnisse von Glucose:Glycin:Kreatinin

Bestimmungen:

über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu$ m) (Gradientenelution TEAP-Puffer-CH<sub>3</sub>CN)

dass sie jeweils der Summe der Molmengen von Glucose und Xylose in dem zu vergleichenden Glucose-Xylose-Modell entsprechen. So ist für das Glucose-Xylose-Glycin-Kreatinin-Modell mit den Molmengenverhältnissen 1:1,5:2:2 das entsprechende Vergleichsmodell ein Glucose-Glycin-Kreatinin-Modell mit einem Molmengenverhältnis von 2,5:2:2.

Aus diesen Modellsystemen kann – wie auch aus Abbildung 3.47 ersichtlich – ein eindeutiger Trend abgeleitet werden. Bei gleichen Molmengenverhältnissen von reduzierendem Zucker zu Glycin und Kreatinin ist die Bildung an MeIQx in Glucose-Xylose-Modellen mit steigendem molaren Anteil an Xylose deutlich geringer als bei vergleichbaren, nur Glucose als reduzierenden Zucker enthaltenden Modellen.

Ersetzt man also in Reaktionsgemischen Glucose mit gewissen Anteilen von Xylose, so kann man den Gehalt an HAAs, speziell denjenigen an MeIQx, deutlich senken. Ab einem Molmengenverhältnis von reduzierendem Zucker zu Glycin und Kreatinin von 4:2:2 ist – auch mit der um den Faktor 10 empfindlicheren HPLC-MS/MS – beim Einsatz sowohl von Xylose als auch von Glucose kein MeIQx mehr nachweisbar.

### 3.8.2 Festsetzung von variablen Parametern für weitere Versuchsreihen

Um einen besseren Vergleich der Reaktivität von reduzierenden Zuckern und unterschiedlichen Carbonylkomponenten im Hinblick auf die Bildung von HAAs herstellen zu können, werden in den folgenden Versuchsreihen die Molmengenverhältnisse von reduzierenden Zuckern bzw. Zwischenstufen der Maillard-Reaktion darstellenden Carbonylverbindungen (oder auch der Summe aus beiden Komponenten) zu Aminosäure und Kreatinin einheitlich auf 1:2:2 – entsprechend dem molmengenabhängigen Maximum der HAA-Bildung – festgesetzt. Der neben Glucose vorhandene, variierende Anteil an weiteren reduzierenden Zuckern bzw. Zwischenprodukten der Maillard-Reaktion von Hexosen und Pentosen wird im Folgenden nur noch „Carbonylkomponente“ genannt. Der Anteil dieser Carbonylkomponenten in der Mischung mit Glucose variiert von 0 mol-% bis 100 mol-%.

### 3.8.3 Einfluss verschiedener Carbonylkomponenten auf die HAA-Bildung

Die zunächst untersuchten Avicel-Modellsysteme (vgl. Abb. 3.48) enthalten in der Regel zwei Carbonylkomponenten, deren Summe jeweils im Molverhältnis 1:2:2 zu Glycin und Kreatinin steht. Die auf einen  $a_w$ -Wert von 0,75 eingestellten Proben wurden einer Langzeit-Niedertemperaturerhitzung bei 120 °C für 6 h unterzogen. In den Glycose enthaltenden Modellen wurde das Mischungsverhältnis von Glucose und einer weiteren Komponente von

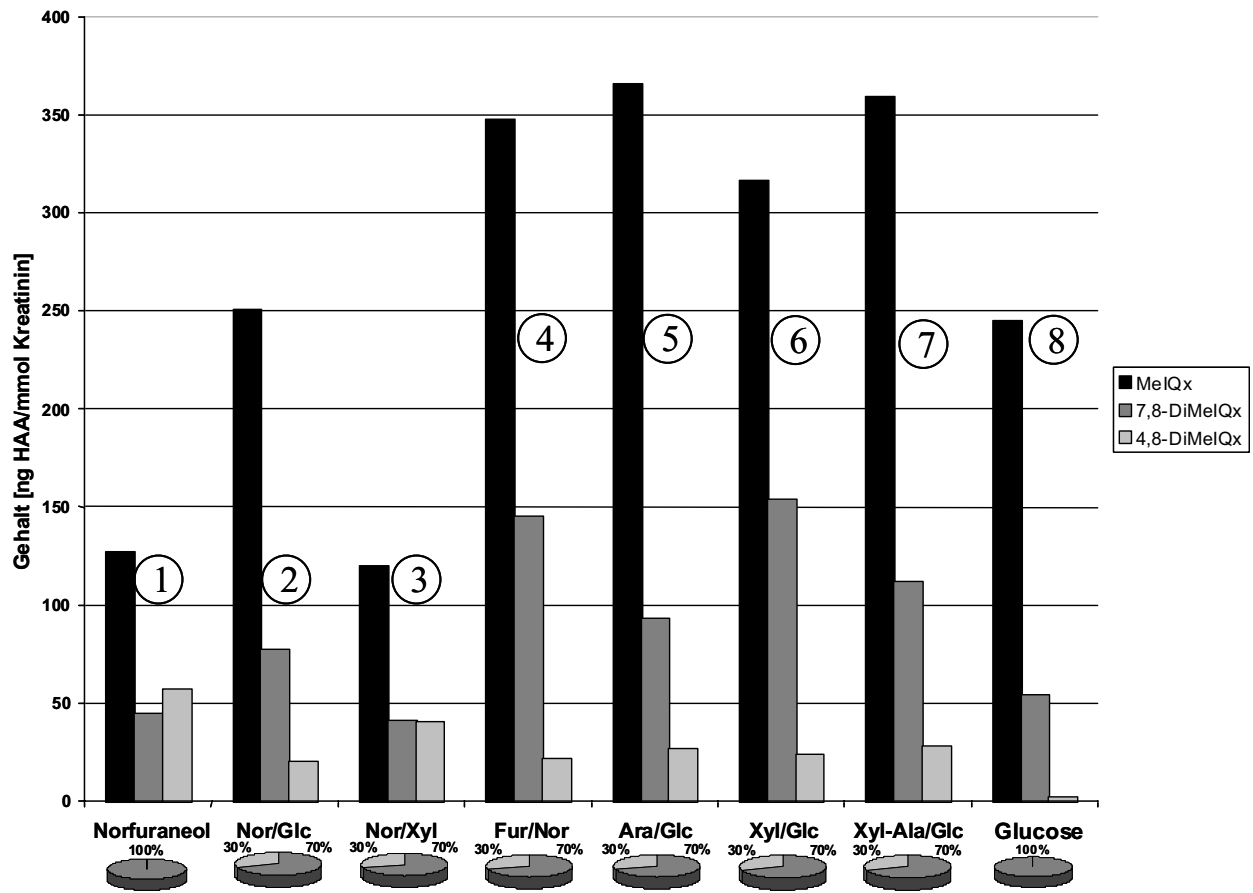
70:30 so gewählt, dass Glucose als Hauptreaktionspartner zur Verfügung steht und die Pentosen bzw. die Pentoseabbauprodukte aus der Maillard-Reaktion noch nicht überwiegen. Ausnahme ist das Modell mit 100 % Glucose bzw. Norfuraneol.

Im Vergleich zu einem Glucose-Referenz-Modell ist bei allen Glucose enthaltenden Modellen mit weiteren Komponenten (Norfuraneol, Furfural, Arabinose, Xylose, Xylulose-Alanin) eine Erhöhung der HAA-Bildung bei gleichbleibenden Molmengenverhältnissen zu Glycin und Kreatinin zu beobachten. Es fällt außerdem auf, dass die Bildungsrate von 7,8-DiMeIQx stark ansteigt. So werden in einem Modell, das Glucose und Furfural im Verhältnis 70:30 enthält (siehe Säulengruppe 4), 94 ng 7,8-DiMeIQx gebildet. Das sind 32 % der gebildeten Menge an MeIQx. Die gebildeten Mengen von 4,8-DiMeIQx, die bei einem nur Glucose enthaltenden Modell kaum erfasst werden können, sind bei den Glucose und eine zusätzliche Carbonylkomponente enthaltenden Modellsystemen deutlich höher. Für ein derartiges Bildungsverhalten kann noch keine Erklärung gegeben werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass der Zusatz von Pentosen und Pentoseabbauprodukten maßgeblich die Bildung von 4,8-DiMeIQx beeinflusst.

Schließt man die Ergebnisse von parallel durchgeführten Versuchen mit Norfuraneol- und Xylose-Norfuraneol-Modellsystemen (Mischungsverhältnis 70/30) in die Betrachtung mit ein, so wird die Komplexität der Reaktionen zur Bildung von HAAs in Mehrkomponentensystemen deutlich.

Die gebildeten Mengen an HAAs in Xylose/Norfuraneol-Modellsystemen entsprechen, wie aus Abbildung 3.48 ersichtlich, etwa den Mengen an HAAs, die in einem reinen Norfuraneol-Modellsystem gebildet werden. Das heißt, für die weiteren Untersuchungen sollte ein Zusatz von Pentose und Pentoseabbauprodukten zu Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Avicel-Modellsystemen den zentralen Schwerpunkt bilden, da größere Effekte von Zusätzen zu beobachten sein werden als bei den auf der Grundmischung von Xylose, Glycin und Kreatinin basierenden Modellsystemen.

Diese erste Versuchsreihe mit unterschiedlichen Zweikomponentensystemen zeigt nur die Bildungsrate bei einem bestimmten Molmengenverhältnis. Um umfassendere Aussagen treffen zu können, wurden in weiteren Arbeiten Zweikomponentensysteme mit unterschiedlicher qualitativer Zusammensetzung und verschiedenen Molmengenverhältnissen untersucht.



**Abbildung 3.48**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = konstant gehaltene Komponenten;

Carbonylkomponenten = variable Komponenten

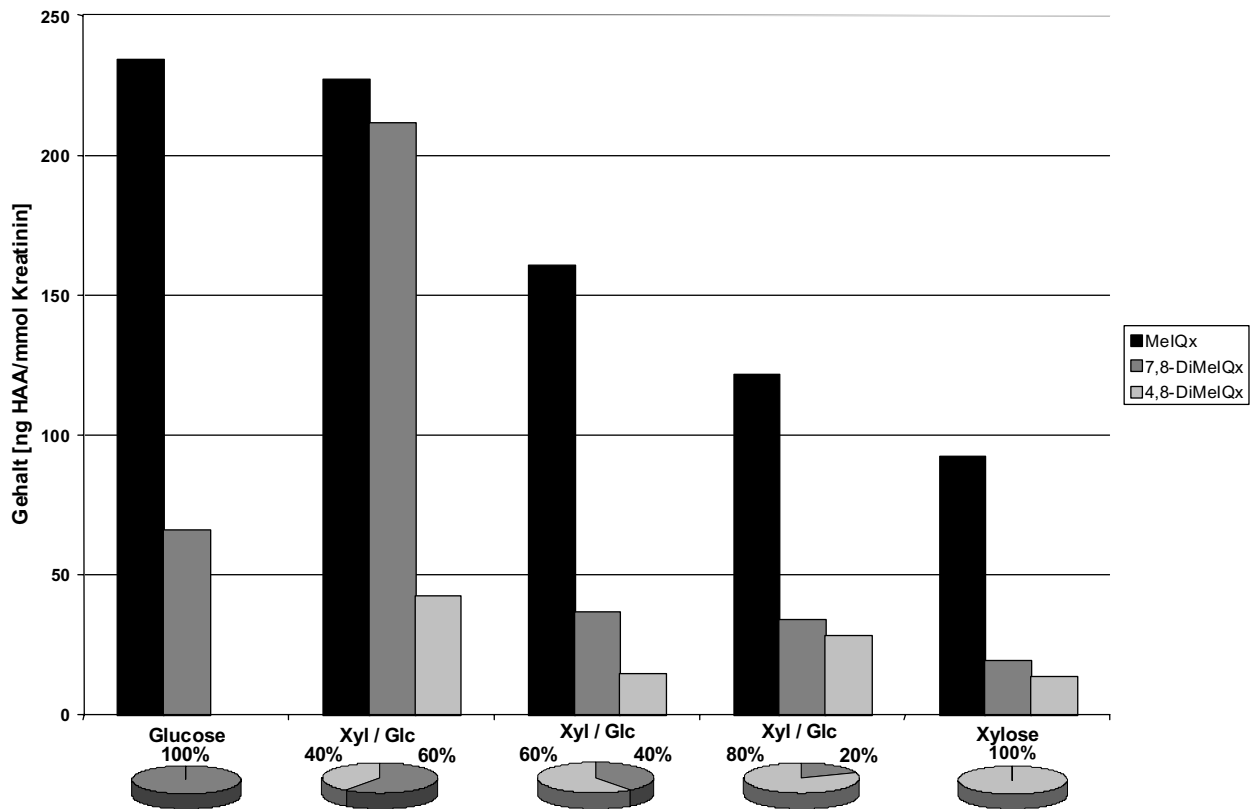
eingesetzte Komponenten: Glucose (Glc), Norfuraneol (Nor), Xylose (Xyl), Furfural (Fur), Arabinose (Ara), Xylulose-Alanin (Xyl-Ala)

molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmungen: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu\text{m}$ ) (Gradientenelution TEAP-Puffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

### 3.8.4 Einfluss unterschiedlicher Anteile von Xylose in Glucose/Glycin/Kreatinin-Modellsystemen

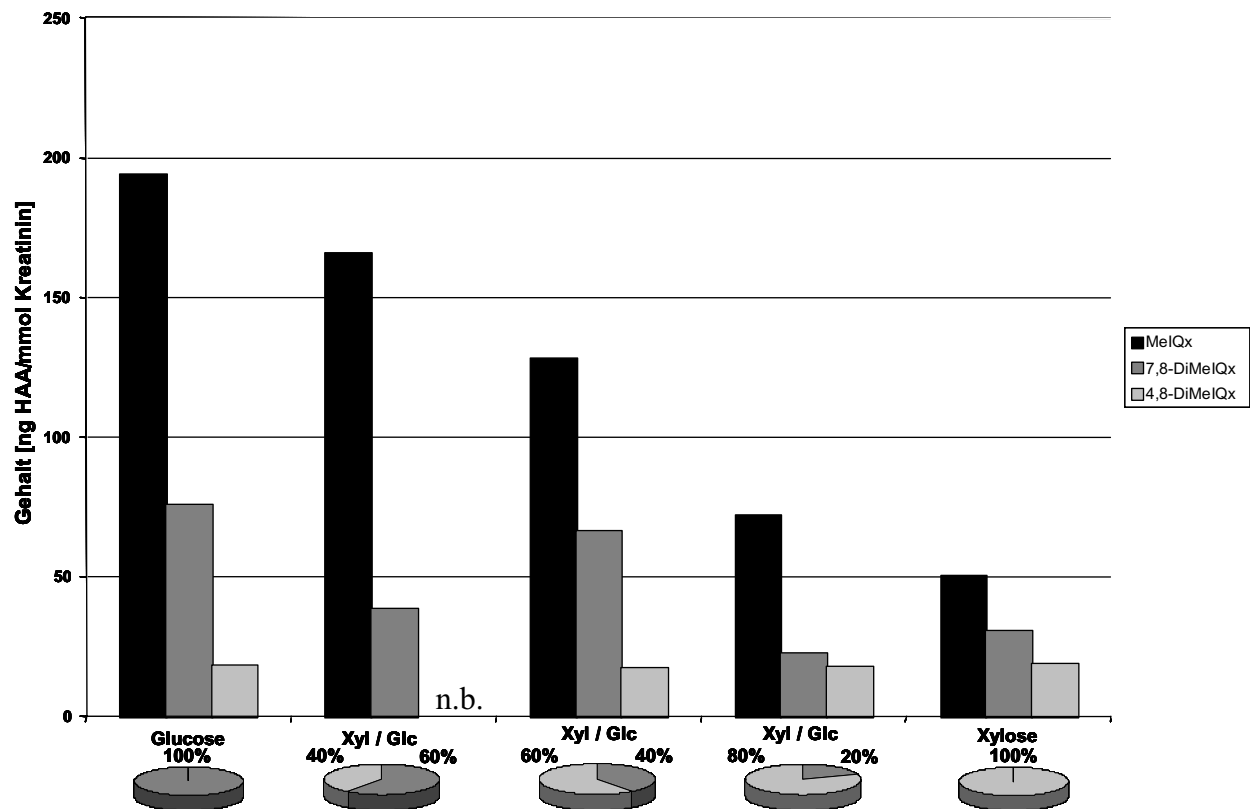
Glucose-Xylose-Zweikomponentensysteme wurden so angesetzt, dass die Molmengenverhältnisse von Glucose zu Xylose 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 und 0/100 betragen. Das Molmengenverhältnis der Summe aus Glucose und Xylose zu Glycin und Kreatinin von 1:2:2 wurde beibehalten. Eine der Lagerung von 10 Tagen bei  $a_w = 0,75$  folgende Erhitzung (vgl. Kapitel 3.2.4) wurde im Sinne einer Langzeit-Niedertemperaturerhitzung 6 Stunden bei 120 °C und im Sinne einer Kurzzeit-Hochtemperaturerhitzung 1 Stunde bei 150 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.49 und 3.50 dargestellt.



**Abbildung 3.49**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Modellsystemen (auf Avicel;  $a_w=0,75$ , 10 d; 120 °C, 6 h)  
 Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten  
 Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose (Glc), Xylose (Xyl)  
 Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponente : Glycin : Kreatinin = 1:2:2  
 Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu$ m) (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Wie aus den Abbildungen 3.49 und 3.50 hervorgeht, zeigt sich sowohl bei der Langzeit-Niedertemperaturerhitzung als auch bei der Kurzzeit-Hochtemperaturerhitzung von Glucose-Xylose-Zweikomponentensystemen mit zunehmendem Anteil an Xylose gegenüber Glucose eine kontinuierliche Verminderung des Gehaltes an HAAs. Auffällig in Abbildung 3.49 ist der mit 228 ng MeIQx/mmol Kreatinin, 211 ng 7,8-DiMeIQx/mmol Kreatinin und mit 42 ng 4,8-DiMeIQx/mmol Kreatinin im Vergleich zu anderen Modellsystemen dieser Versuchsreihe recht hohe Gesamtgehalt an HAAs im Modellsystem mit einem Xylose-Glucose-Mischungsverhältnis von 40:60. Auffallend ist der relativ hohe Gehalt an 7,8-DiMeIQx, der mit der „Las-Vegas-Hypothese“ nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) nicht erklärt werden kann. Ebenso kann die Bildung von 4,8-DiMeIQx bei diesem stark glucosehaltigen



**Abbildung 3.50**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Modellsystemen (auf Avicel;  $a_w = 0,75$ , 10 d; 150 °C, 1 h)  
 Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten  
 Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose (Glc), Xylose (Xyl)  
 Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2  
 Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu\text{m}$ ) (Gradientenelu. Ammoniumformatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Modellsystem nicht erklärt werden. Gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ wird MeIQx aus den Zwischenstufen 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und aus dem Strecker-Abbau von Glycin hervorgehendem Formaldehyd, 7,8-DiMeIQx aus den Zwischenstufen 2,3,5-Trimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd gebildet. Das beim Einsatz bereits geringer Mengen an Xylose wider Erwarten gebildete 4,8-DiMeIQx entsteht dagegen – entsprechend der „Las-Vegas-Hypothese“ – aus 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und Acetaldehyd.

Die gebildeten Mengen an HAAs aus nur Glucose bzw. nur Xylose enthaltenden Modellen sind bekannt. Würden in jeweils voneinander unabhängigen Reaktionen mit Glucose oder Xylose die HAAs anteilig gebildet, so könnte man unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Glucose/Xylose-Mengenverhältnisse die Mengen an HAAs in den untersuchten Zweikomponentensystemen abschätzen. Es zeigt sich jedoch, dass die tatsächlich ermittelten Mengen an HAAs höher sind als die aufgrund der obigen Überlegungen abgeschätzten Werte. Die bei der Bildung der HAAs beteiligten Reaktionen, ausgehend von Glucose und Xylose, müssen daher einander beeinflussen. Offensichtlich handelt es sich um synergistische Effekte

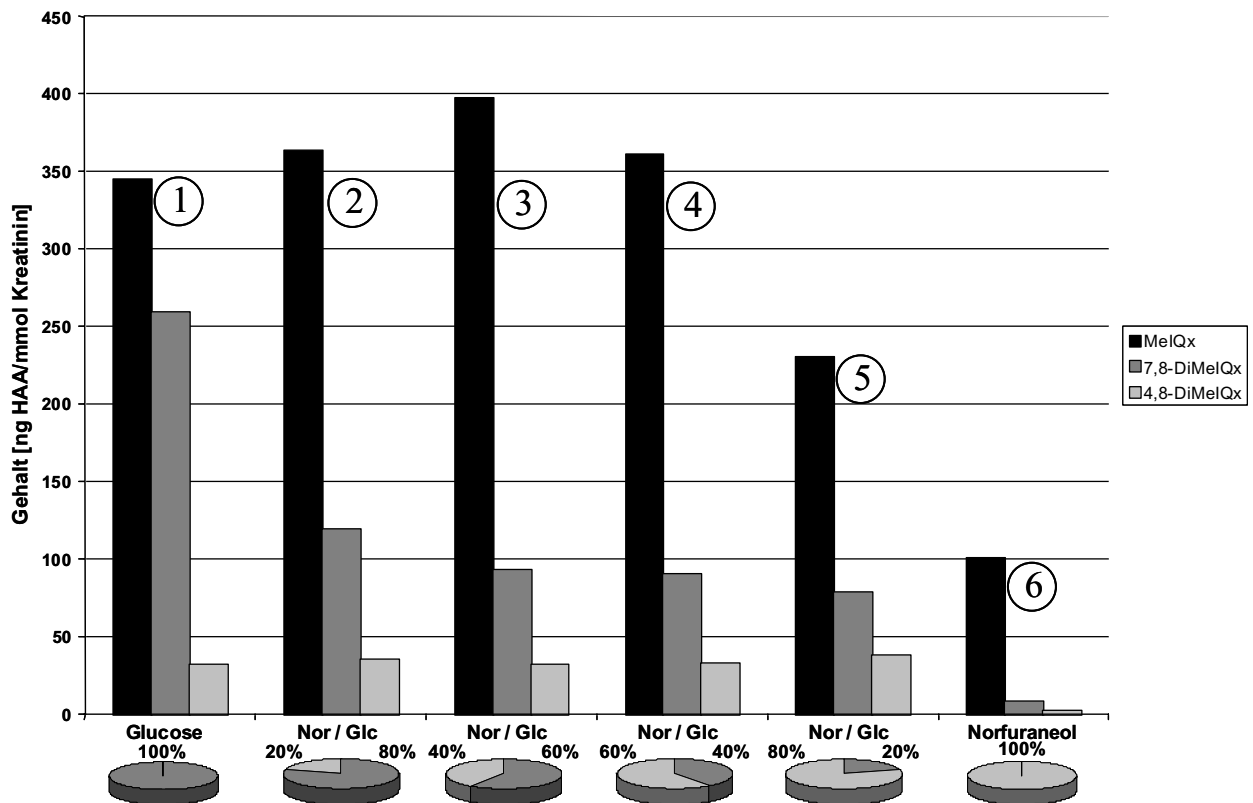


zwischen den unterschiedlichen Reaktionswegen von Glucose und Xylose, die mit diesen Modellsystemen nicht zu erklären sind.

### 3.8.5 Einfluss unterschiedlicher Anteile an Norfuraneol in Glucose/Glycin/Kreatinin-Modellsystemen

In den durchgeführten eigenen Arbeiten wurde das Pentoseabbauprodukt Norfuraneol als Carbonylkomponente neben Glucose eingesetzt. Die Norfuraneol-Xylose-Zweikomponentensysteme wurden so angesetzt, dass die Molmengenverhältnisse von Glucose zu Norfuraneol 100/0, 80/20, 60/40, 40/60, 20/80 und 0/100 betragen. Die Summe der Molmengen an Glucose und Norfuraneol steht mit Glycin und Kreatinin im Verhältnis 1:2:2, also im Maximum der HAA-Bildung. Eine der Lagerung von 10 Tagen bei  $a_w = 0,75$  folgende Erhitzung (vgl. Kapitel 3.2.4) wurde im Sinne einer Kurzzeit-Hochtemperaturerhitzung bei 150 °C für 1 Stunde durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.51 dargestellt. Vergleicht man zunächst die bei 150 °C (Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung) bzw. 120 °C (Niedertemperatur-Langzeit-Erhitzung) erhitzten, neben Kreatinin und Glycin nur Glucose enthaltenden Modellsysteme (Säulengruppe 1 in Abb. 3.51 verglichen mit Säulengruppe 8 in Abb. 3.48), so fällt auf, dass bei der Hochtemperatur-Kurzzeit-Erhitzung neben einer höheren Gesamtmenge an HAAs besonders die Bildung von 7,8-DiMeIQx stark erhöht ist. Andererseits verringert sich die Gesamtmenge der HAAs in den entsprechenden, neben Kreatinin und Glycin nur Norfuraneol enthaltenden Modellsystemen bei 150 °C für 1 Stunde im Vergleich zu einer sechsstündigen Erhitzung bei 120 °C (6. Säulengruppe in Abb. 3.51 gegenüber der 1. Säulengruppe in Abb. 3.48). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Temperatureinfluss auf die HAA-Bildung in den nur Norfuraneol als Carbonylkomponente enthaltenden Modellen geringer ist als in den Glucose enthaltenden Modellen; auffällig ist dabei, dass bei der höheren Temperatur 4,8- und 7,8-DiMeIQx nur noch in wesentlich geringeren Mengen gebildet werden.

In Abbildung 3.51 fällt weiter auf, dass die Mengen an 7,8-DiMeIQx mit zunehmendem Anteil an Norfuraneol stetig sinken, während die Menge an 4,8-DiMeIQx bis auf das neben Kreatinin und Glycin nur Norfuraneol enthaltende Modell annähernd konstant bleibt. Demgegenüber verhält sich Norfuraneol hinsichtlich der Bildung von MeIQx in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zu Glucose ambivalent: bis zu einem Glucose-Norfuraneol-Mischungsverhältnis von 60/40 ist mit steigendem Norfuraneol-Anteil auch eine zunehmende Bildung von MeIQx zu beobachten. Erhöht man den Norfuraneol-Anteil auf 60 % und darüber hinaus, so tritt ein signifikanter Rückgang der MeIQx-Bildung auf.



**Abbildung 3.51**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 1 h)

Modellzusammensetzung:

Glycin, Kreatinin = fix; Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten:

Glucose (Glc), Norfuraneol (Nor)

Molare Mengenverhältnisse:

Carbonylkomponenten: Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmungen:

über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (4  $\mu\text{m}$ ) (Gradientenelution TEAP-Puffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Eine Erklärung für eine derartige, vom Anteil an Norfuraneol in der Mischung abhängige MeIQx-Bildungsrate lässt sich mit den bekannten HAA-Bildungshypothesen und -postulaten (vgl. Kapitel 1.1.3) nicht finden. Wie bereits in Kapitel 3.7.2 bemerkt, verhält sich Norfuraneol in Einkomponentensystemen ähnlich wie andere reduzierende Zucker, ohne dass man daraus Rückschlüsse auf die abgelaufenen Reaktionen ziehen könnte. Ein radikalischer Bildungsweg unter Einbeziehung des Norfuraneols wäre denkbar. Aufgrund seiner chemischen Struktur wäre Norfuraneol in der Lage, verschiedene stabile mesomere Radikalstrukturen auszubilden.

In Arbeiten von Kikugawa et al. [Lit. 134] wird der Einfluss von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol), 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanon und 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2H)-furanon auf die Bildung eines mit ESR messbaren Pyrazin-Radikalkations beschrieben. Norfuraneol gehört ebenfalls in die Gruppe der 4-Hydroxy-3(2H)-furanone und könnte sich demnach ähnlich verhalten. Ein Zusatz dieser Reduktone fördert die Bildung des beschriebenen Pyrazin-Radikalkations. Den Einfluss von Norfuraneol

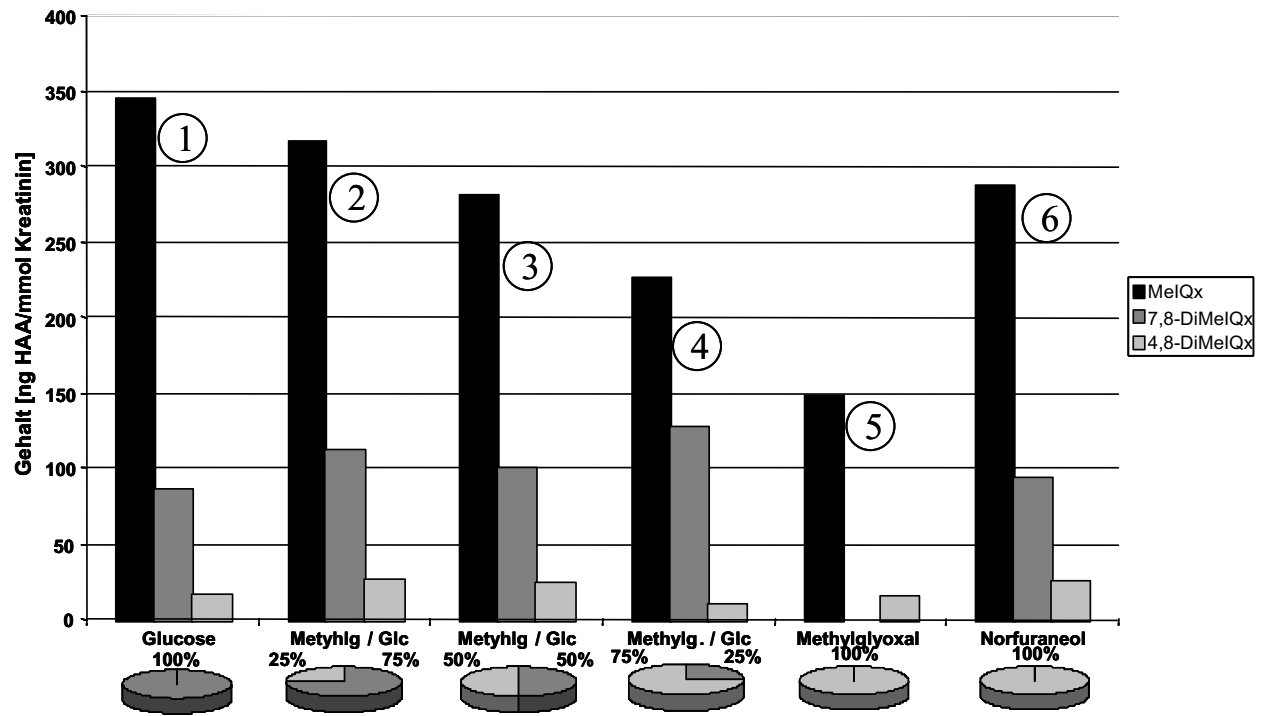
anhand wenig konkreter Bildungsmechanismen unter Einbeziehung von Pyrazin-Radikalen zu beschreiben, wäre jedoch zu spekulativ.

### 3.8.6 Einfluss unterschiedlicher Anteile an Methylglyoxal in Glucose/Glycin/Kreatinin-Modellsystemen

Die Glucose-Methylglyoxal-Zweikomponentensysteme wurden so angesetzt, dass die Molmengenverhältnisse von Glucose zu Methylglyoxal 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 und 0/100 betragen. In dieser Versuchsreihe wurde zusätzlich ein Norfuraneol-Vergleichsmodell mit dem Verhältnis Norfuraneol zu Glycin zu Kreatinin von 1:2:2 angesetzt. Nach einer Lagerung von 10 Tagen bei  $a_w = 0,75$  wurden die Modellsysteme im Sinne einer Langzeit-Niedertemperaturerhitzung 6 Stunden bei 120 °C erhitzt (vgl. Kapitel 3.2.4). Wie aus Abbildung 3.52 hervorgeht, sinkt mit zunehmendem Anteil an Methylglyoxal an der Reaktionsmischung der Gehalt an MeIQx stetig. Signifikante Veränderungen des Gehaltes an 4,8- und 7,8-DiMeIQx sind – wie aus der Abbildung ersichtlich – nicht zu erkennen. Lediglich in dem 100 % Methylglyoxal enthaltenden Modellsystem ist kein 7,8-DiMeIQx nachzuweisen.

Des Weiteren liegen die absoluten Gehalte an HAAs bei dem 100 % Methylglyoxal enthaltenden Modell niedriger als bei einem analog erhitzten Norfuraneol-Vergleichsmodell (vgl. 6. Säulengruppe in Abb. 3.52). Die ermittelten HAA-Gehalte eines neben Glycin und Kreatinin nur Methylglyoxal enthaltenden Modellsystems (Abb. 3.52, 5. Säulengruppe) sind mit denen aus den zuvor beschriebenen Einkomponentensystemen mit Methylglyoxal als Carbonylkomponente (vgl. Abb. 3.41) vergleichbar. Ähnlich wie beim Glucose-Xylose-Zweikomponentensystem liegen die in Abbildung 3.52 dargestellten Mengen an HAAs über denen einer rechnerischen Aufsummierung von anteilsabhängigen Mengen an HAAs. Daher ist zu vermuten, dass die HAAs nicht nur aus den Abbaustufen der beiden Carbonyle entstehen, sondern im Vorfeld Maillard-Reaktionsprodukte von Glucose und Methylglyoxal miteinander in Reaktion treten können, was zu einer erhöhten Bildungsrate der HAAs führt.

Wie bereits beschrieben, kann die so genannte fortgeschrittene Phase der Maillard-Reaktion von Hexosen über Keto-Enol-Umlagerungen der Amadori-Produkte und nach vinyloger  $\beta$ -Eliminierung (Wasserabspaltung) zur Bildung sehr reaktiver  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen (u. a. 3-Desoxyhexosulose und 1,4-Didesoxyhexosulose) führen, die ihrerseits durch Retro-Aldolreaktionen gespalten werden können. Dabei entstehen kurzkettige  $\alpha$ -Dicarbonyle wie Methylglyoxal oder Glyoxal. Feather und Harris [Lit. 51] postulierten die Bildung von Glyceraldehyd und Pyruvaldehyd (Methylglyoxal) aus 3-Desoxy-erythro-hexosulose. Weenen



**Abbildung 3.52**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 120 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung:

Glycin, Kreatinin = konstant gehaltene Komponenten;

Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose (Glc), Methylglyoxal (Methylg), Norfuranol

Molare Mengenverhältnisse:

Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

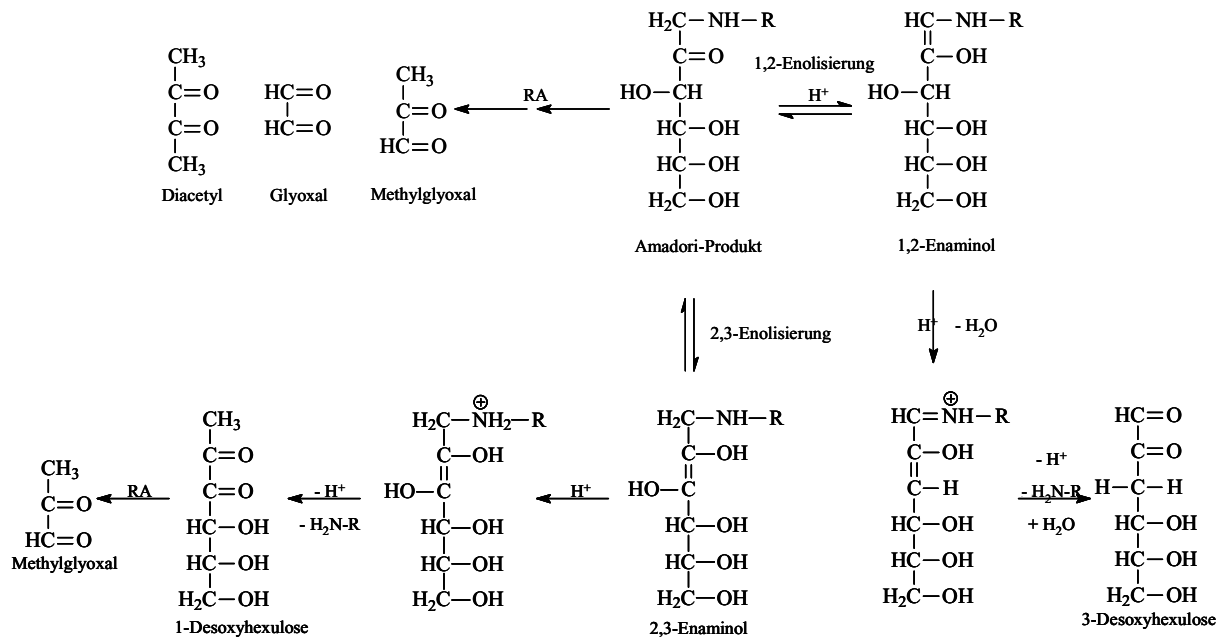
Bestimmung:

über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

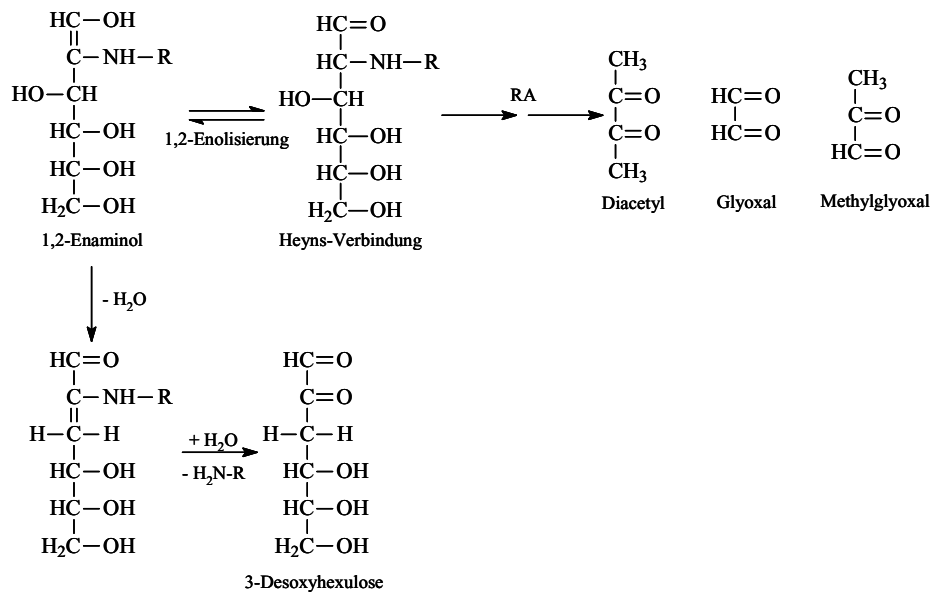
[Lit. 311] konnte ausgehend von  $^{13}\text{C}$ -markierten Hexose-Amadoriverbindungen die Bildung von relevanten Verbindungen wie Methylglyoxal oder Hydroxyaceton bestätigen. Rousev [Lit. 239] stellte in seinen Arbeiten die Bildung von Methylglyoxal als einen bevorzugten Reaktionsweg von Amadori- und Heyns-Umlagerungsprodukten in gepufferten, auf  $\text{pH} = 7$  eingestellten wässrigen Reaktionsmedien dar. Ein Reaktionsschema ist in Abbildung 3.53 zu sehen.

Glomb äußert in seinen Arbeiten [Lit. 67] die Vermutung, dass es neben der nicht-oxidativen Retroaldol-Spaltung oxidative Prozesse zur Bildung von Methylglyoxal geben könnte. In fermentierten erhitzten Lebensmitteln wie Kakao und Kaffee sowie in vivo wird Methylglyoxal hauptsächlich über den enzymatischen und den nicht-enzymatischen Abbau von Triosephosphaten aus der Glykolyse beschrieben [Lit. 289]. Auch bei Karamelisierungsprozessen wird die Bildung von Methylglyoxal beobachtet. Hofmann [Lit. 99] beschreibt zwar Methylglyoxal als wichtigen Precursor für die Bräunung von wässrigen Pentose-Aminosäure-Reaktionsmischungen. Die genauen Reaktionsschritte hin zu Bräunungsprodukten sind jedoch noch unbekannt. Auch in Hexose-Aminosäure-Reaktionsmischungen können größere Mengen

## Reaktionswege von Amadori-Verbindungen



## Reaktionswege von Heyns-Verbindungen



**Abbildung 3.53**

Schematische Darstellung bevorzugter Reaktionswege von Amadori-Verbindungen (oben) und Heyns-Verbindungen (unten) nach Roussev [Lit. 239] unter besonderer Berücksichtigung von Retroaldolspaltungen (RA)

Methylglyoxal nachgewiesen, aber nicht in direkte Korrelation zu entstehenden Bräunungsprodukten gebracht werden.

In den eigenen Arbeiten konnte der Einfluss von Methylglyoxal auf die Bildung von HAAs in wasserarmen glycin- und kreatininhaltigen Reaktionsmischungen mit Anteilen an Glucose nur

als Statusbericht dargestellt werden. Genaue Reaktionsmechanismen bzw. bevorzugt ablaufende Konkurrenzreaktionen zur HAA-Bildung können nicht konkret formuliert werden.

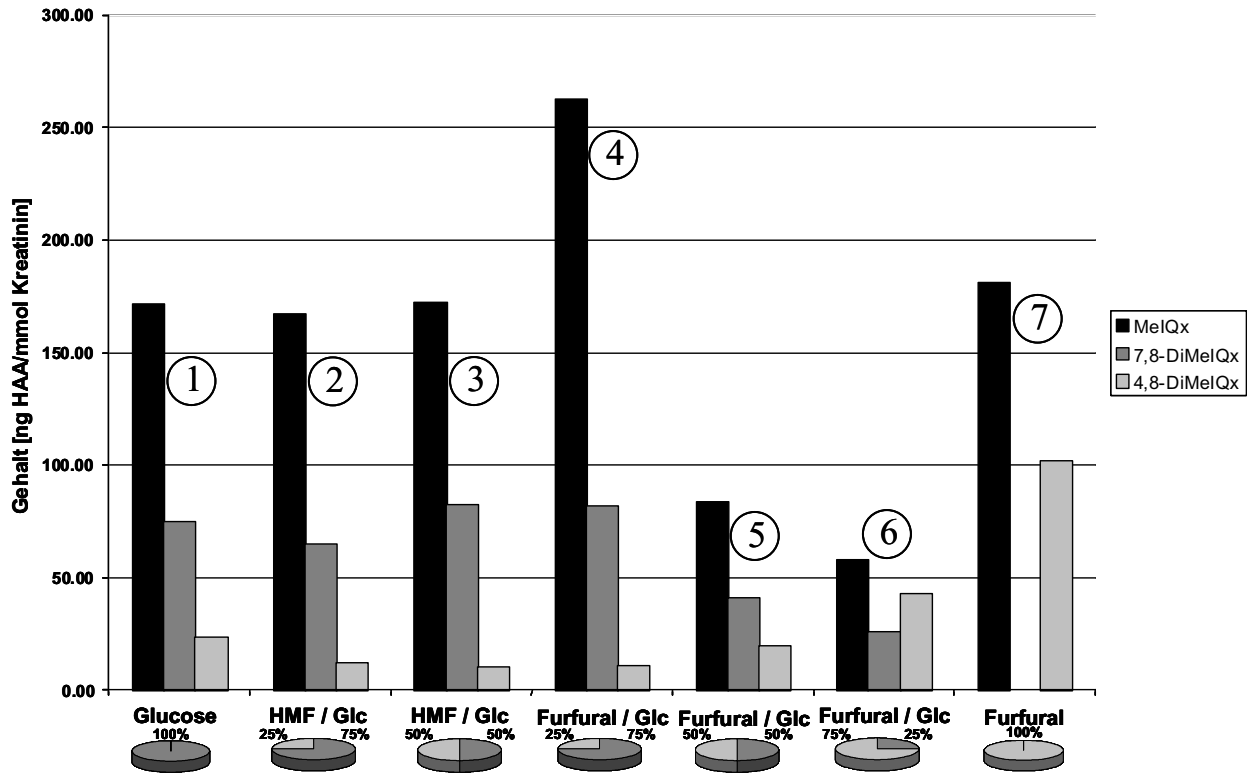
### 3.8.7 Einfluss weiterer Zusätze zu Glucose/Glycin/Kreatinin-Modellsystemen

In den folgenden Modellversuchen wurde der Einfluss einer Reihe weiterer, aus der Maillard-Reaktion hervorgehender Carbonylkomponenten in Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenen Avicel-Modellsystemen auf die HAA-Bildung studiert. Im Einzelnen wurden die folgenden Carbonylkomponenten eingesetzt: 5-Hydroxymethylfuran-2-aldehyd (HMF), Furan-2-aldehyd (Furfural), 2,5-Dimethyl-4-Hydroxy-3(2H)-furanon (Furaneol), 2,3-Butandion (Diacetyl) und Hydroxy-2-propanon (Hydroxyaceton).

Die Modellsysteme wurden generell zunächst zehn Tage bei  $a_w = 0,75$  gelagert (vgl. Kapitel 3.2.4) und anschließend im Sinne einer Langzeit-Niedertemperatur-Erhitzung 6 Stunden bei 125 °C erhitzt.

Wie aus Abbildung 3.54 ersichtlich, verändert sich in den HMF enthaltenden Modellen sowohl der Gehalt an MeIQx als auch an 4,8- und 7,8-DiMeIQx bei steigendem Anteil an HMF in der Mischung nicht signifikant.

HMF wird häufig bei Lebensmitteln, wie z. B. Honig und Fruchtsäften, als Indikatorverbindung für eine stattgefundene Erhitzung angesehen. Die Bildung von HMF kann zum einen aus Enolisierungs- und Dehydratisierungsreaktionen von Hexosen im sauren Milieu stattfinden, zum anderen kann aus den 3-Desoxyosen von Hexosen unter Ringöffnung, Enolisierung und Wasserabspaltung das entsprechende 3,4-Didesoxyoson formuliert werden, dessen Halbacetalform unter Wasserabspaltung direkt zum HMF weiterreagieren kann. Daher wird es häufig als Markersubstanz für den 1,2-Enolisierungsweg im Verlauf der Maillard-Reaktion betrachtet. HMF ist chemisch gegenüber Kondensationsreaktionen mit weiteren Folgeprodukten der Maillard-Reaktion und thermisch gegenüber höheren Erhitzungstemperaturen stabil. Andererseits wird von Kieninger [Lit. 133] diskutiert, dass HMF, welches als typisches Produkt der Maillard-Reaktion auch in hellen Malzen nachweisbar ist, die Farbbildung im weiteren Verlauf des Brauprozesses durch Reaktionen mit weiteren Bestandteilen des Bieres zu hochmolekularen Kondensationsprodukten erheblich beeinflussen soll. Detaillierte Ausführungen zu dieser These gibt es jedoch nicht. Skog und Jägerstad [Lit. 263] setzen in ihren Arbeiten eine wässrige Modelllösung mit Kreatin bzw. Kreatinin und einem Überschuss an HMF an.



**Abbildung 3.54**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 125 °C, 6 h)

Modellzusammensetzung:

Glycin, Kreatinin = konstant gehaltene Komponenten

Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten:

Glucose (Glc), Hydroxymethylfurfural (HMF), Furfural

Molare Mengenverhältnisse:

Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung:

über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammonium-ormiatpuffer-CH<sub>3</sub>CN)

Es konnte eine Verminderung des Kreatin- bzw. Kreatiningehaltes nach Erhitzung unter Rückfluß beobachtet werden, was sich auf eine Addukt-Bildung der beiden Modellkomponenten zurückführen lässt. Bereits Laser Reuterswärd et al. [Lit. 149] zeigten, dass Kreatinin zwar ein für die HAA-Bildung notwendiger Precursor ist, dessen Konzentration aber kein die Menge an HAAs beeinflussender Faktor ist; denn Kreatinin war in den eingesetzten Modellsystemen und in den untersuchten verarbeiteten Lebensmitteln auch nach Abschluss der Reaktion noch nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass nur wenige Procente im Rahmen der zur Bildung der HAA führenden Maillard-Reaktion verbraucht werden. Ferner konnten sie nachweisen, dass erhöhte Glucosekonzentrationen in Lebensmitteln und damit einhergehend auch erhöhte Gehalte an HMF den Ringschluss vom Kreatin zum Kreatinin zumindest teilweise unterdrücken. Bei Untersuchungen an Muskelfleisch ist die Einflussnahme von HMF auf den Ringschluss von Kreatin zum Kreatinin nicht zu vernachlässigen, da in diesem Fall natürlicherweise Kreatin und Kreatinin im Verhältnis je nach Alter, Herkunft und Art der Schlachtung bei etwa 2:1 vorliegen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Glucose-Furfural-Zweikomponentensysteme mit Molmengenverhältnissen von Glucose zu Furfural von 100/0, 75/25, 50/50, 25/75 und 0/100 untersucht. Während wechselnde Anteile von HMF zu glucosehaltigen Modellsystemen die Art und Menge der gebildeten HAAs nicht beeinflussen (siehe Abbildung 3.54, Säulengruppen 2 und 3 im Vergleich zu Säulengruppe 1), verstärkt demgegenüber ein Anteil von 25 % Furfural die MeIQx-Bildung im Vergleich zu einem 100 % Glucose enthaltenden Modell erheblich, während sich die Mengen an 4,8- und 7,8-DiMeIQx nicht signifikant verändern. Bei einer Erhöhung des Anteils von Furfural auf 50 % und 75 % geht dagegen die Bildung von MeIQx stark zurück. Die Summen der gebildeten Mengen an 4,8- und 7,8-DiMeIQx bleiben zwar bei den in Abbildung 3.54 dargestellten Modellen nahezu gleich, jedoch erhöht sich, wie aus Abbildung 3.54 ersichtlich, in den Furfural enthaltenden Modellen das Verhältnis der gebildeten Mengen an 4,8- und 7,8-DiMeIQx mit zunehmendem Anteil an Furfural stetig. Bei einem nur Furfural, Glycin und Kreatinin im Molmengenverhältnis von 1:2:2 enthaltenden Avicel-Modellsystem ist nach entsprechender Erhitzung pro mmol Kreatinin etwa 180 ng MeIQx und 100 ng 4,8-DiMeIQx, aber kein 7,8-DiMeIQx nachweisbar.

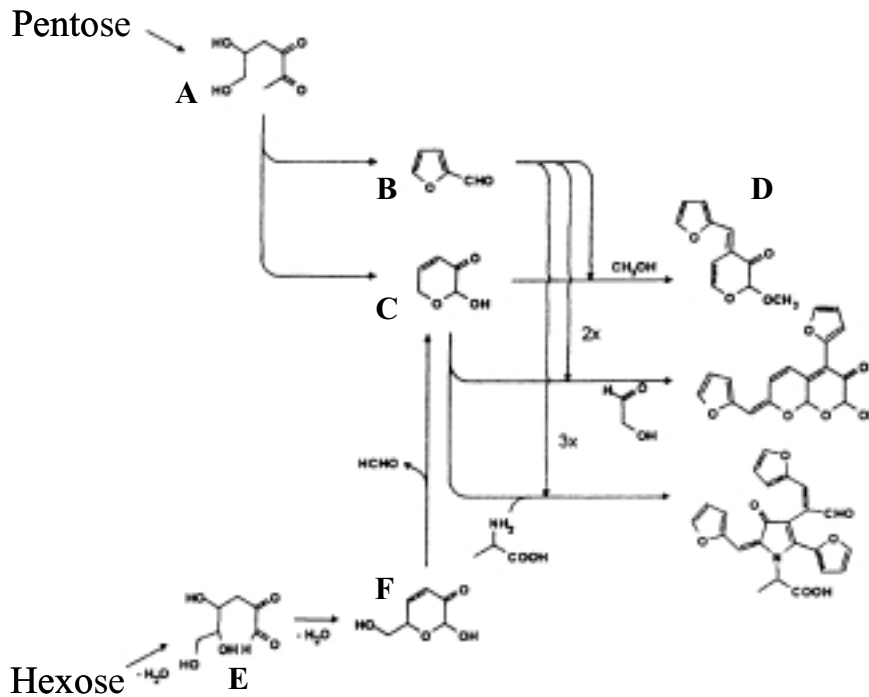
Hofmann et al. [Lit. 100, 178] stellten in ihren Arbeiten (vgl. Abb. 3.55) fest, dass in Gegenwart von primären Aminosäuren, wie Alanin oder Glycin, das aus dem 3-Desoxyoson (Abb. 3.55, A) einer Pentose entstandene Pyranon (C) mit Furfural (B), das ebenfalls durch Ringschluss des entsprechenden Desoxyosons entsteht, kondensiert (siehe Kondensationsprodukt D in Abb. 3.55). Daher ist anzunehmen, dass die in Abbildung 3.55 dargestellten Kondensationsreaktionen zur HAA-Bildung in Konkurrenz treten.

Im Rahmen der dargestellten Kondensationsreaktion entsteht u. a. das (*E*)-2-methoxy-4-[(2-furyl)methylene]-2*H*-pyran-3-one (D), welches nur in Form des Methylethers isoliert und identifiziert werden konnte. Ein derartiges Bräunungsprodukt kann auch aus Hexosen über entsprechende 3-Desoxyhexulosen (E) gebildet werden. Dabei kann aus dem korrespondierenden Pyranon (F) unter Abspaltung von Formaldehyd durch eine Retro-Aldolreaktion das Pentose-Pyranonderivat (C) entstehen. Je nach vorliegender Aminosäure kann Glucose mit Furfural direkt (z. B. beim Vorhandensein geringer Mengen an Prolin) oder indirekt über das Pyranonderivat (C) höherkondensierte Farbstoffe ausbilden.

Somit ist es vorstellbar, dass in Glucose-Furfural-Reaktionsmischungen auf die beschriebene Weise die Mengen des Eduktes Glucose direkt bzw. die Mengen der daraus entstehenden 3-Desoxyosone, aus denen die für die HAA-Bildung nötigen Pyridine und Pyrazine entstehen, reduziert werden. Folge wäre dann eine verminderte HAA-Bildung. Die Entstehung beträcht-



licher Mengen an HAAs aus Furfural, Glycin und Kreatinin kann jedoch nach heutigem Kenntnisstand nicht erklärt werden.

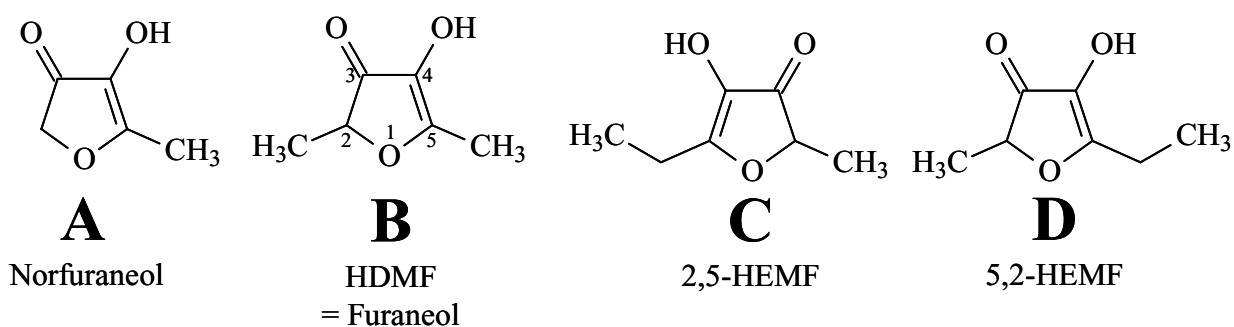


**Abbildung 3.55**

Ausschnitt aus dem schematischen Darstellung der im Rahmen der Maillard-Reaktion an der Bildung von niedermolekularen Bräunungsprodukten beteiligten Reaktionen, ausgehend von Pentosen und Hexosen; nach Marko und Hofmann [Lit. 178]

In wässrigen gepufferten Reaktionsmedien konnten Blank und Fay [Lit. 26] in Pentose/Aminosäuresystemen neben Norfuranol (Verbindung A) auch noch 4-Hydroxy-2,5-Dimethyl-3(2H)-furanon (Furaneol, HDMF, Verbindung B), 4-Hydroxy-2-ethyl-5-methyl-3(2H)-furanon (2,5-HEMF, Verbindung C) und 4-Hydroxy-5-ethyl-2-methyl-3(2H)-furanon (5,2-HEMF, Verbindung D, Abb. 3.56) nachweisen. Verbindung B entsteht aus glycinhaltigen Reaktionsansätzen, die Verbindungen C und D entstehen aus alaninhaltigen Ansätzen. Von Blank und Fay durchgeführte Markierungsexperimente konnten zeigen, dass hierbei das C<sub>5</sub>-Grundgerüst der Pentosen um eine C<sub>1</sub>- bzw. C<sub>2</sub>-Einheit durch Aldolkondensation mit dem aus der Strecker-Reaktion entstandenen Formaldehyd bzw. Acetaldehyd verlängert wird. Nebenwege, bei denen der Formaldehyd aus einer Retroaldol-Spaltung eines 1-Desoxyosons freigesetzt wird oder bei denen aus hypothetischen C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pentose-Spaltungsprodukten Verbindung A entstehen kann, sind denkbar.

Ausgehend von den beschriebenen Erkenntnissen wurde in den eigenen Arbeiten daher der Einfluss von Furaneol auf die HAA-Bildung in Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.57 dargestellt. Die Glucose-

**Abbildung 3.56**

Aus Pentose/Aminosäuresystemen gebildete Abbauprodukte mit 3(2*H*)-furanon-Struktur

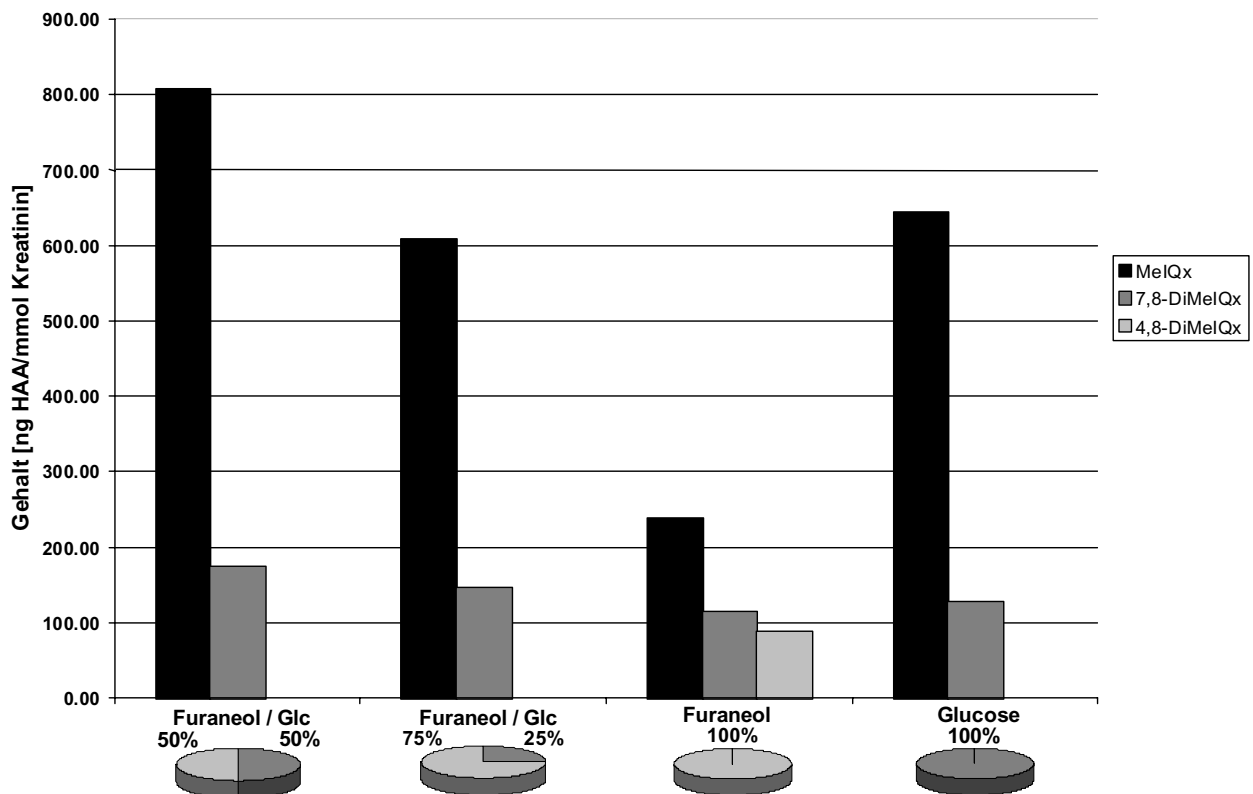
Furaneol-Zweikomponentensysteme wurden so angesetzt, dass das Molmengenverhältnis von Glucose zu Furaneol 100/0, 50/50, 25/75 und 0/100 beträgt. Nach der Lagerung von 10 Tagen bei  $a_w = 0,75$  wurden die Modellsysteme zwei Stunden bei 150 °C erhitzt. Temperatur und Erhitzungszeit wurden so gewählt, dass, wie in den Arbeiten von Kikugawa et al. [Lit. 134] formuliert, ein möglicherweise intermediär gebildetes Pyrazin-Radikalkation bevorzugt entstehen kann. Weiterhin postulierten Kikugawa et al. [Lit. 134], dass ein Zusatz von Furaneol die Bildung des beschriebenen Pyrazin-Radikalkations fördert.

Im Weiteren wird angenommen, dass die Menge dieses Pyraziniumkations im Reaktionsmedium mit der Menge der über den nach Pearson [Lit. 222] (vgl. Kapitel 1.1.3) formulierten radikalischen Mechanismus gebildeten HAAs korreliert. Im Widerspruch dazu steht – wie von den Autoren beschrieben – die Beobachtung, dass eine Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltende wässrige Modellmischung eine größere mutagene Aktivität aufwies als eine Modellmischung des Furaneols mit Glycin und Kreatinin.

Letztere Aussage kann mit den Mengen der in den eigenen Modellversuchen gebildeten HAAs bestätigt werden, wie aus Abbildung 3.57 hervorgeht. In einem nur Glucose enthaltenden Modell der oben beschriebenen Versuchsreihe ließen sich nach Erhitzung 644 ng MeIQx/mmol Kreatinin nachweisen, in einem entsprechend aufgearbeiteten, nur Furaneol enthaltenden Modellsystem jedoch nur 239 ng MeIQx/mmol Kreatinin. Lediglich bei einem Glucose-Furaneol-Mischungsverhältnis von 50/50 konnte mit 808 ng MeIQx/mmol Kreatinin eine über der im Glucose-Vergleichsmodell liegende Menge an HAAs bestimmt werden. Die Menge an 7,8-DiMeIQx ändert sich im Verhältnis zur Menge an MeIQx nicht signifikant. Auffällig ist, dass 4,8-DiMeIQx bei den hierbei gewählten Erhitzungsbedingungen nur im reinen Furaneol-Glycin-Kreatinin-Modell gebildet wird.

Die aus den beschriebenen Glucose-Furaneol-Zweikomponentensystemen in Abhängigkeit vom Furaneol-Anteil erhaltenen Ergebnisse sind wenig aussagekräftig; erst die zeitliche analytische Verfolgung des Reaktionsverlaufs hätte möglicherweise genaueren Aufschluss über

die Rolle des Furaneols bei der Entstehung des zur Diskussion stehenden, die HAA-Bildung fördernden Pyrazin-Radikalkations geben können.



**Abbildung 3.57**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 2 h)

Modellzusammensetzung:

Glycin, Kreatinin = konstant gehaltene Komponenten;

Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose (Glc), Furaneol

Molare Mengenverhältnisse:

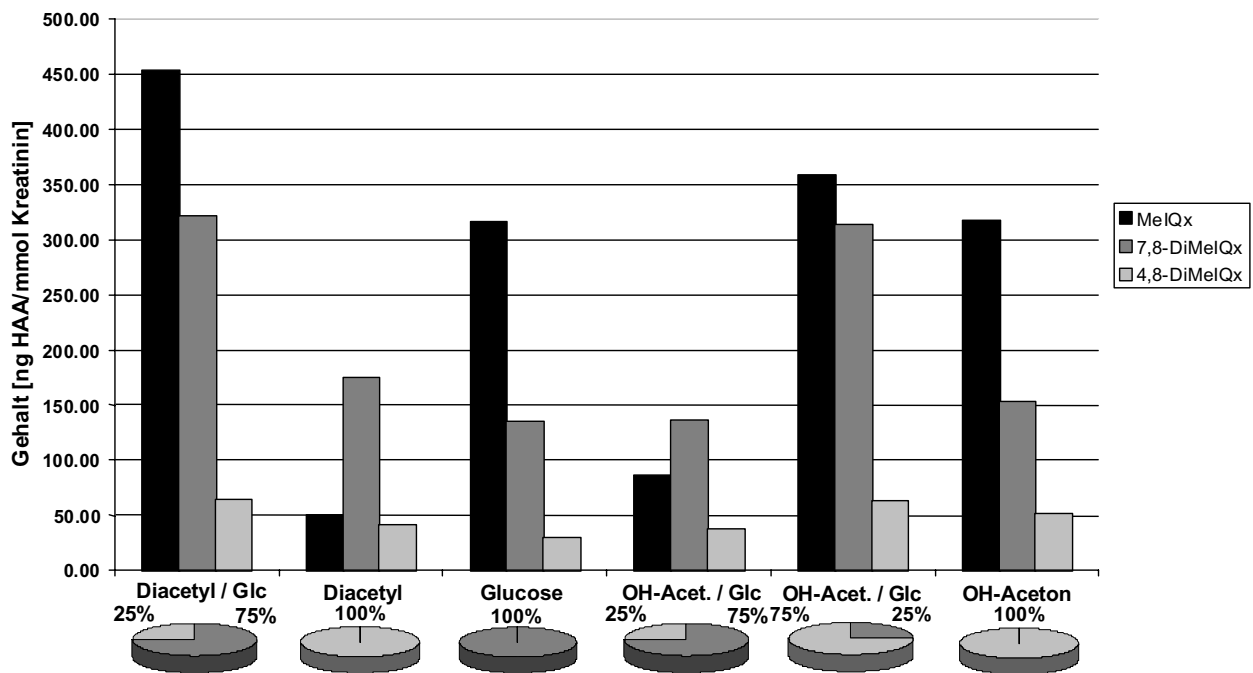
Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung:

über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Diacetyl als Bestandteil eines Zweikomponentensystems wurde deswegen gewählt, weil dessen Bildung nach Retroaldol-Spaltung und Wasserabspaltung aus Amadori- und Heyns-Verbindungen denkbar ist. In Fleisch und Fisch wird Diacetyl, wenn auch in weit geringeren Mengen als die Schlüsselaromastoffe Octanal, Nonanal, 2,4-Decadienal, Methanthiol, 2-Furfurylthiol sowie 2-Methyl-3-furanthiol als charakteristische Aromakomponente gebildet. Ein Zusatz von Diacetyl zu einem Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem erhöht – wie aus Abbildung 3.58 ersichtlich – die Bildung von MeIQx. Die Bildung von 7,8-DiMeIQx ist gegenüber einem nur Glucose enthaltenden Vergleichsmodell ebenfalls erhöht. In einem wasserarmen Modell auf Avicel-Basis, das Diacetyl, Glycin und Kreatinin im Verhältnis 1:2:2 enthält (zweite Säulengruppe in Abb. 3.58), ist die Menge an MeIQx gegenüber dem 100 % Glucose enthaltenden Modell stark verringert. Mit 175 ng 7,8-DiMeIQx/mmol

Kreatinin kann jedoch eine im Vergleich zu den Mengen an MeIQx und 4,8-DiMeIQx dreifach erhöhte Menge bestimmt werden. In wässrigen, Glycin und Diacetyl enthaltenden Modellsystemen konnten Parihar et al. [Lit. 221] auch 2,3,5-Trimethylpyrazin, aus dem nach dem Bildungspostulat von Jägerstad durch Reaktion mit Formaldehyd (gebildet durch Strecker-Abbau von Glycin) und Kreatinin 7,8-DiMeIQx entstehen kann, nachweisen. Dementsprechend werden in dem neben Glycin und Kreatinin Diacetyl enthaltenden, von in den eigenen Arbeiten untersuchten wasserarmen Modellsystem auch erhöhte Mengen an 7,8-DiMeIQx gebildet, wie aus Abbildung 3.58 hervorgeht.



**Abbildung 3.58**

Bildung von HAAs in glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 1 h)

Modellzusammensetzung: Glycin, Kreatinin = konstant gehaltene Komponenten;  
Carbonylkomponenten = variable Komponenten

Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose (Glc), Diacetyl, Hydroxyaceton (OH-Aceton)

Molare Mengenverhältnisse: Carbonylkomponenten : Glycin : Kreatinin = 1:2:2

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer-CH<sub>3</sub>CN)

Hydroxyaceton (Hydroxy-2-Propanon) ist ebenfalls ein durch die nicht-enzymatische Bräunung gebildetes Abbauprodukt von Monosacchariden. Hofmann [Lit. 100] beschreibt in seinen Arbeiten erstmalig eine quantitative Bestimmung von Hydroxycarbonylen, zu denen auch Hydroxyaceton zählt, über eine Isotopenverdünnungsanalyse mittels GC-MS nach Oximierung mit O-Ethylhydroxylammoniumchlorid. In einem wässrigen Glucose-Alanin-Modellsystem konnte er zunächst Glyoxal als Hauptreaktionsprodukt bestimmen. Mit zunehmender Erhitzungsdauer sank einerseits der Gehalt an Glyoxal; andererseits konnte er einen Anstieg der Mengen an C<sub>3</sub>-Komponenten wie Methylglyoxal und Hydroxyaceton beobachten. Auch bei

Xylose-Alanin-Modellsystemen konnte Hofmann einen stetigen starken Anstieg der Mengen an Hydroxyaceton mit fortschreitender Reaktionszeit beobachten. An wasserarmen Modellsystemen ist die Bildung von Hydroxyaceton bisher noch nicht untersucht worden. Hydroxyaceton kann auch in einer Strecker-Reaktion von Methylglyoxal mit sekundären Aminen entstehen.

In den eigenen Untersuchungen sind keine mit dem Anteil an Hydroxyaceton in Verbindung zu bringende Tendenzen erkennbar, da sowohl die Gesamtmengen der HAAs als auch die Mengen von MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx in keinem systematischen Zusammenhang mit der Modellzusammensetzung stehen.

### **3.9 Bildung von HAAs in Avicel-Modellsystemen auf Fleischextraktbasis**

#### **3.9.1 Zusammensetzung von käuflichem Fleischextrakt**

Fleischextrakt ist die durch Konzentrieren der wasserlöslichen Bestandteile des Skelettmuskels entstehende pastöse Masse. Sie ist je nach Ausgangsmaterial hell- bis dunkelbraun. Je nach Provenienz unterscheidet man zwischen Rindfleisch-, Schweinefleisch oder Hühnerfleischextrakt. Im Folgenden beziehen sich die Ausführungen über die eigenen Arbeiten auf Rindfleischextrakt. Insbesondere Sulser [Lit. 279] beschreibt eingehend die Herstellung, die Zusammensetzung sowie die allgemeinen Qualitätsanforderungen an Fleischextrakt. Seine Ausführungen haben bis heute noch Gültigkeit. Fleischextrakt ist praktisch fett- und proteinfrei. Der Restwasser- und Aschegehalt beträgt etwa 20 %. Die größten Mengen an Fleischextrakt stammen aus Argentinien und Brasilien, da Fleischextrakt in diesen Ländern als anfallendes Nebenprodukt der weltweit dort konzentrierten Corned-Beef-Herstellung gewonnen werden kann.

Eine genau definierte Herstellungsweise gibt es nicht, da jeder Hersteller eigene, als Betriebsgeheimnis nicht zugängliche Herstellungsverfahren benutzt. Diese sind eine bestimmte Abfolge von unterschiedlichen Eindampfschritten, wobei der letzte für die Aromabildung verantwortlich ist. Zunächst muss bei der Herstellung zerkleinertes mageres Rindfleisch möglichst ohne Knochen und Sehnen bei 90 °C im Gegenstromverfahren etwa 20 min extrahiert werden. Man erhält einen Extrakt mit 1,5 % bis 5 % Trockenmasse, der noch Fett enthalten kann. Dieses muss durch Separatoren entfernt werden, ehe der Extrakt in mehrstufigen Vakuumverdampfern bei fallenden Temperaturen (92 °C bis 46 °C) auf etwa 45 % bis 65 % Trockenmasse vorkonzentriert werden kann. Eine Endkonzentrierung erfolgt unter Luftzutritt oder im Teilvakuum bei maximal 65 °C. In diesem letzten Verarbeitungsschritt bilden sich die

charakteristischen Aromakomponenten von gebratenem Fleisch. Deshalb wird Fleischextrakt häufig als Grundstoff für Suppen, Saucen und Brüherzeugnisse sowie für die Herstellung von Reaktionsaromen verwendet.

Das pastöse Enderzeugnis – Fleischextrakt in Pulverform wäre zu hygroskopisch – besteht zum größten Teil aus Aminosäuren und Peptiden und weiteren Stickstoffverbindungen, unter denen Kreatin und Kreatinin mengenmäßig den größten Teil darstellen. Daneben sind in Fleischextrakt auch Dipeptide (Carnosin, 3,1 % bis 5,7 %; Anserin (0,4 % bis 1 %)) und quartäre Ammoniumverbindungen wie Carnitin und Cholin als stickstoffhaltige Nebenbestandteile in größerer Menge vorhanden. Zu den stickstofffreien Extraktstoffen, die aus dem zur Herstellung eingesetzten Fleisch herausextrahiert werden, gehören Glykogen und Glucose, Inosit bzw. der Geschmacksverstärker Inosin-5'-monophosphat (IMP) sowie zahlreiche organische Säuren.

	Mittelwert (g/100 g)	Bereich (g/100 g)
Gesamte organische Substanz	60	56 – 64
Aminosäuren und Peptide		12 – 20
· Asparaginsäure	0,0226	
· Threonin	0,798	
· Serin	0,103	
· Asparagin	0,0238	
· Glutaminsäure	0,144	
· Prolin	0,0806	
· Glycin	0,177	
· Alanin	0,803	
· Valin	0,925	
· Cystein	n.n.	
· Methionin	0,0313	
· Isoleucin	0,0551	
· Leucin	0,0866	
· Tyrosin	0,0761	
· Phenylalanin	0,145	
· $\gamma$ -Aminobuttersäure	n.n.	
· Ornithin	0,0462	
· Lysin	0,0819	
· Histidin	0,0605	
· Tryptophan	0,125	
· Arginin	0,125	
· Taurin	0,691	
· Carnosin	3,947	
Andere stickstoffhaltige Verbindungen		10 -15
· Gesamtkreatinin		5,4 – 8,2
· Ammoniak		0,2 – 0,4
· Harnstoff		0,1 – 0,3
Stickstofffreie Verbindungen		10 – 15
· Gesamtlipide		Spuren bis 1,5
Pigmentstoffe		10 – 20
Mineralstoffe (als Gesamtasche berechnet)	20	18 – 24
Natriumchlorid		2,5 – 5,0
Wasser	20	15 – 23
pH-Wert einer 10 %igen Lösung ca. 5,5		n.n. = nicht nachweisbar

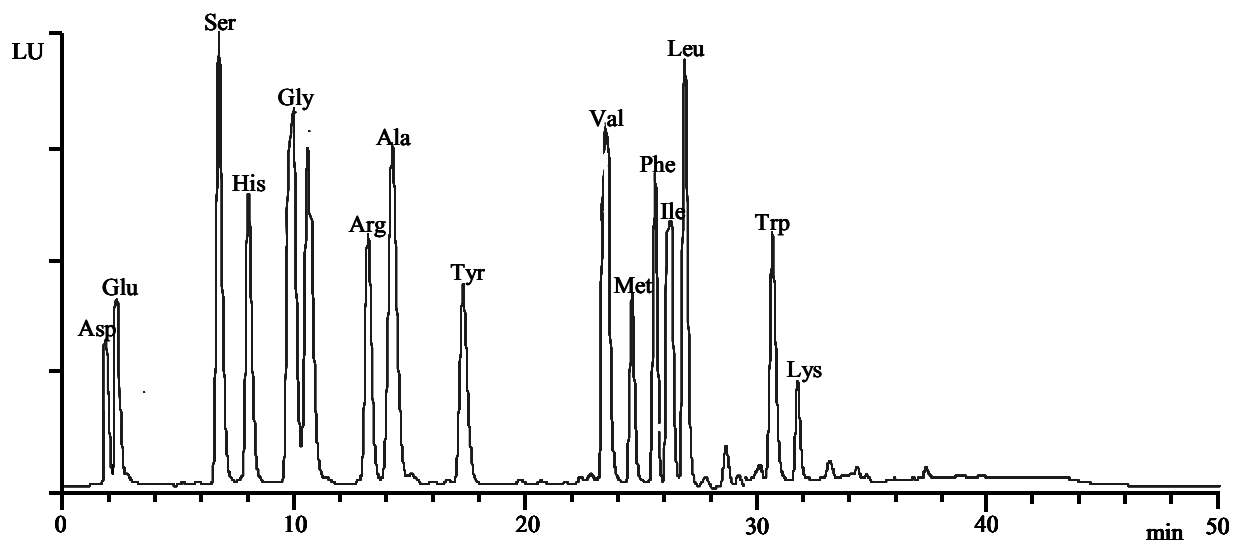
**Tabelle 3.6**

Allgemeine Zusammensetzung von handelsüblichen Rindfleischextrakten nach Sulser [Lit. 280]

Da diese letztgenannten Verbindungen bis auf Teile an Inosit und IMP während der fortwährenden Erhitzungsprozesse zum Teil zu Maillard-Reaktionsprodukten weiterreagieren, sind sie im käuflichen Fleischextrakt nicht mehr nachweisbar. Einen Überblick über die Inhaltsstoffe von Rindfleischextrakten gibt Tabelle 3.6.

Untersuchungen des Rohstoffes Fleischextrakt beschränken sich in den eigenen Arbeiten auf die Parameter Kreatinin-, Aminosäure- und Kohlenhydratgehalt. Es wurde bereits aromatisierter Fleischextrakt als Fertigprodukt aus der Lebensmittelindustrie bezogen.

Die Bestimmung des Gesamtkreatinins, das definitionsgemäß die Summe aus Kreatin und Kreatinin, berechnet als Kreatinin, darstellt, in dem eingesetzten Fleischextrakt mit Pikrinsäure ergab einen Gehalt von 5,7 g/100 g Fleischextrakt. Während der Erhitzung des Fleischextraktes (Verlust an Kreatinin etwa 5 %) wird das Kreatinin zu geringen Mengen an HAAs und zu weiteren Maillard-Verbindungen umgesetzt. Die qualitative Analyse von Aminosäuren wurde mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA durchgeführt (vgl. Kapitel 6.10.3). Ein HPLC-Chromatogramm eines Standardgemisches von Aminosäuren ist in Abbildung 3.59 zu sehen.

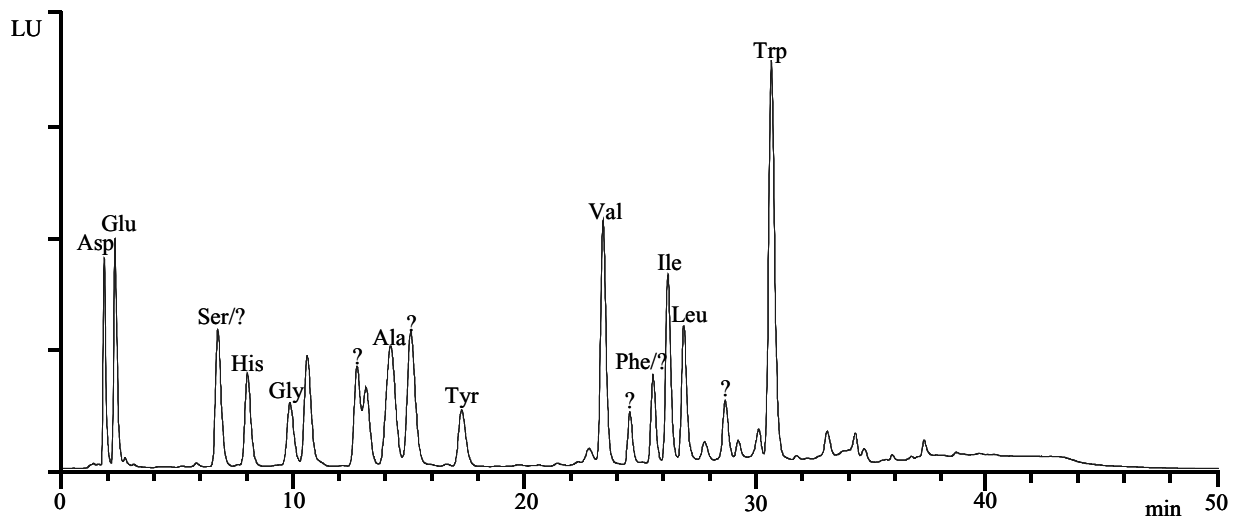


**Abbildung 3.59**

HPLC-Chromatogramm (fluorimetrische Detektion) einer mit o-Phthalaldehyd in gepufferter Lösung umgesetzten Aminosäure-Standardmischung (Vorsäulenderivatisierung); Probenvorbereitung, Derivatisierung, HPLC-Trennung, Detektion unter Kapitel 6.10.2; Zuordnung (jeweils L-Aminosäuren): Asp = Asparaginsäure, Glu = Glutaminsäure, Ser = Serin, His = Histidin, Gly = Glycin, Arg = Arginin, Ala = Alanin, Tyr = Tyrosin, Val = Valin, Met = Methionin, Phe = Phenylalanin, Ile = Isoleucin, Leu = Leucin, Trp = Tryptophan, Lys = Lysin

Aus dem Chromatogramm des nach Kapitel 6.10.3 aufgearbeiteten Fleischextrakts (Abb. 3.60) ist zu erkennen, dass Asparagin, Glutamin, Serin, Histidin, Glycin, Alanin, Tyrosin, Valin, Phenylalanin, Isoleucin, Leucin und Tryptophan jeweils in unterschiedlichen Men-

gen vorhanden sind. Dabei liegen die identifizierten Aminosäuren in Konzentrationen zwischen 1 und 3 mmol/100 g Fleischextrakt vor.



**Abbildung 3.60**

HPLC-Chromatogramm (fluorimetrische Detektion) des mit o-Phthalaldehyd in gepufferter Lösung umgesetzten wässrigen Extraktes von Aminosäuren (Vorsäulenderivatisierung) des in den eigenen Arbeiten eingesetzten Fleischextraktes; Probenvorbereitung, Derivatisierung, HPLC-Trennung, Detektion unter 6.10.2

### 3.9.2 Zusammensetzung von Modellen auf der Basis von Fleischextrakt

In den eigenen Arbeiten wurde der Einfluss des Zusatzes verschiedener Carbonylkomponenten zu Fleischextrakt in wasserarmen Modellsystemen untersucht. Die Zusammensetzung derartiger Modellsysteme in Verbindung mit einer Erhitzung auf über 130 °C führt zu Produkten, die einem industriell hergestellten Reaktionsaroma zur Erzielung eines Fleischgeschmackes recht nahe kommen. Um eine Vergleichbarkeit mit den bisher in den eigenen Arbeiten untersuchten wasserarmen Avicel-Modellsystemextrakt sicherzustellen, wurde eine Vormischung hergestellt, die zu gleichen Teilen Fleischextrakt und Avicel enthielt (genaue Arbeitsvorschrift siehe Kapitel 6.5.3). Nach dem allgemein als gültig anerkannten Bildungspostulat nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) sind für die Bildung von HAAs ein reduzierender Zucker, eine Aminosäure sowie Kreatinin nötig. Aminosäuren und Kreatinin sind bereits im Fleischextrakt (vgl. Tabelle 3.6) und somit auch in der Vormischung enthalten, sodass nur noch ein reduzierender Zucker bzw. eine entsprechende Carbonylkomponente dem Modellsystem hinzugefügt wurde. Die Zugabe an Zucker bzw. Carbonylkomponente zu Gesamtkreatinin erfolgte im molaren Verhältnis von 1:2.

Bei den in den eigenen Arbeiten untersuchten so genannten Einkomponentensystemen auf Basis von Fleischextrakt handelt es sich um wasserarme Modellsysteme, die neben der Trägermatrix Avicel und Fleischextrakt noch eine weitere Komponente enthalten (zur Herstel-



lung vgl. Arbeitsvorschrift, Kapitel 6.5.3). Da in den eigenen Arbeiten bei wasserarmen Methylglyoxal-Glycin-Kreatinin-Modellsystemen mit Erhöhung des Anteils an Methylglyoxal die Menge der gebildeten HAAs wider Erwarten stetig zunahm (vgl. Kapitel 3.6.3), wurde im Rahmen der Untersuchung von wasserarmen Modellsystemen auf der Basis von Fleischextrakt auch der Einfluss verschiedener Mengen an Methylglyoxal auf die Bildung von HAAs näher betrachtet. Als Carbonylkomponenten wurden weiterhin Glucose, Xylose und Norfuranol eingesetzt.

In zahlreichen Untersuchungen u. a. von Schuirmann [Lit. 246] konnte festgestellt werden, dass Fleischextrakt, der frei von reduzierenden Zuckern ist, unter Hitzeeinwirkung geringe Mengen an HAAs bilden kann. Reduziert man den Wassergehalt des Fleischextraktes, so steigt die Menge an gebildeten HAAs.

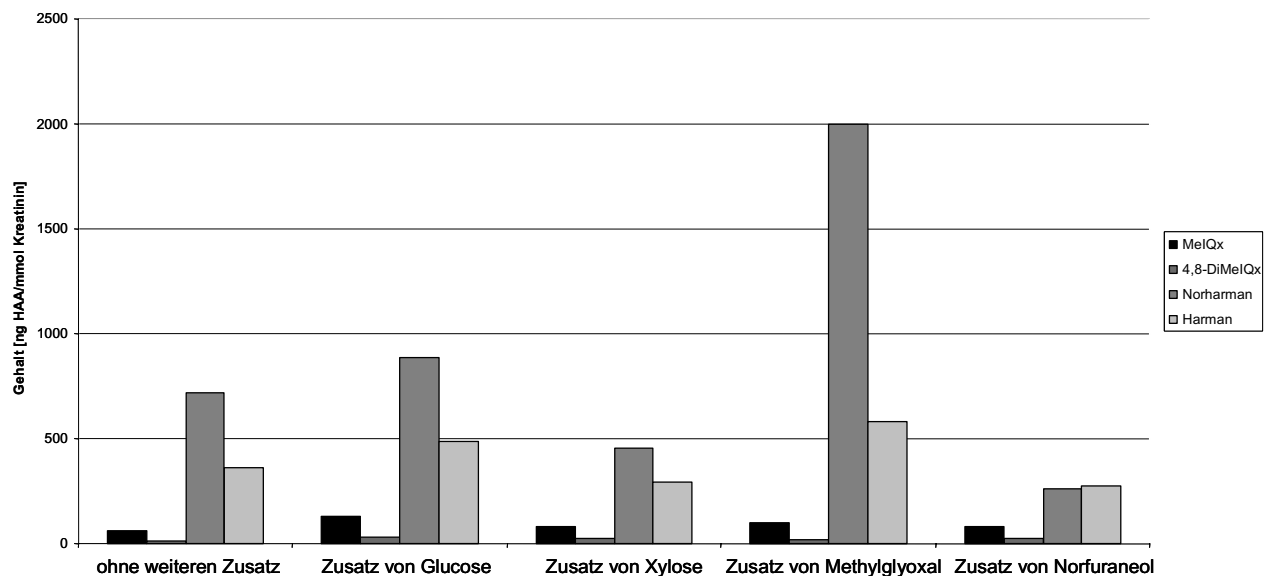
Vollenbröker [Lit. 307] stellte unter Laborbedingungen die Herstellung eines Reaktionsaromas in einem wässrigen Medium – der Reaktionsansatz hatte einen Wassergehalt von 65 % – unter Verwendung verschiedenener Zusätze nach. U. a. setzte er Xylose im Molmengenverhältnis zu der durch den Fleischextrakt eingebrachten Menge an Gesamtkreatinin von 3:1 ein. Er beobachtete eine vollständige Unterdrückung der MeIQx-Bildung. Auch Skog [Lit. 256] konnte in wässrigen Reaktionsansätzen auf der Basis von Fleischextrakt ab einem Zusatz einer Menge von 1g Glucose pro g Fleischextrakt eine Unterdrückung der MeIQx-Bildung beobachten. Geht man von einem mittleren Gesamtkreatininingehalt des eingesetzten Fleischextraktes aus (vgl. Tabelle 3.6), so ergibt sich hierbei ein Molmengenverhältnis von Glucose zu Gesamtkreatinin von 12:1. Da die Zusammensetzung je nach Provenienz des verwendeten Fleischextraktes stark schwanken kann, sind diese Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar.

Um den wesentlichen Einfluss verschiedener Zusätze zu Fleischextrakt herauszustellen, ist es sinnvoll, zunächst Untersuchungen an wasserarmen, Fleischextrakt enthaltenden Avicel-Modellsystemen im wassergehaltsabhängigen Maximum der Maillard-Reaktion, bei  $a_w = 0,75$ , mit unterschiedlichen Zusätzen vorzunehmen. Ob die so erhaltenen Ergebnisse auch auf die bei der industriellen Herstellung üblichen wässrigen Reaktionsmatrices übertragen werden können, muss im Anschluss geprüft werden. Goldbeck [Lit. 69] konnte in wasserarmen Avicel-Modellsystemen auf der Basis von Fleischextrakt ein ambivalentes Verhalten der reduzierenden Zucker Glucose bzw. Xylose auf die HA-Bildung beobachten. Bei seinen Untersuchungen ergab sich ein Optimum der HAA-Bildung jeweils bei einem Molmengenverhältnis von reduzierendem Zucker zu Gesamtkreatinin von 1:2. Auf der Basis seiner Untersuchungen wurde der Einfluss weiterer Carbonylkomponenten auf die Bildungsrate von

HAAs ermittelt. Dabei ist zu überprüfen, ob Erkenntnisse aus den in eigenen Arbeiten untersuchten Einkomponentensystemen mit Norfuraneol und Methylglyoxal (vgl. Kapitel 3.6) auf wasserarme Avicel-Modellsysteme auf Fleischextraktbasis übertragen werden können. Gelingt dies, so kann man allgemein aufzeigen, inwieweit in bestimmten fleischhaltigen Lebensmitteln vorkommende bzw. aus Rezepturbestandteilen von bestimmten fleischhaltigen Lebensmitteln im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildete Carbonylkomponenten Einfluss auf die Menge und Art der in Reaktionsaromen gebildeten HAAs nehmen.

Dabei wird stets die zugesetzte Menge an der variablen Komponente im halbmolaren Verhältnis zu der durch den Fleischextrakt eingebrachten molaren Menge an Kreatin und Kreatinin, berechnet als Gesamtkreatinin, zugegeben.

Wie aus Abbildung 3.61 zu entnehmen, werden bei der Erhitzung von wasserarmen Modellen auf Fleischextraktbasis mit verschiedenen Zusätzen auch große Mengen an Harman und Norharman gebildet.



**Abbildung 3.61**

Bildung von HAAs in Avicel-Modellsystemen auf Basis von Fleischextrakt unter Zusatz von Glucose bzw. weiteren Carbonylkomponenten ( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 1 h)

Modellzusammensetzung: Anteil an Fleischextrakt mit bestimmtem Kreatinin- und Aminosäuregehalt = konstant

Carbonylkomponente = variable Komponente,  
Molverhältnis zu Kreatinin 1:2

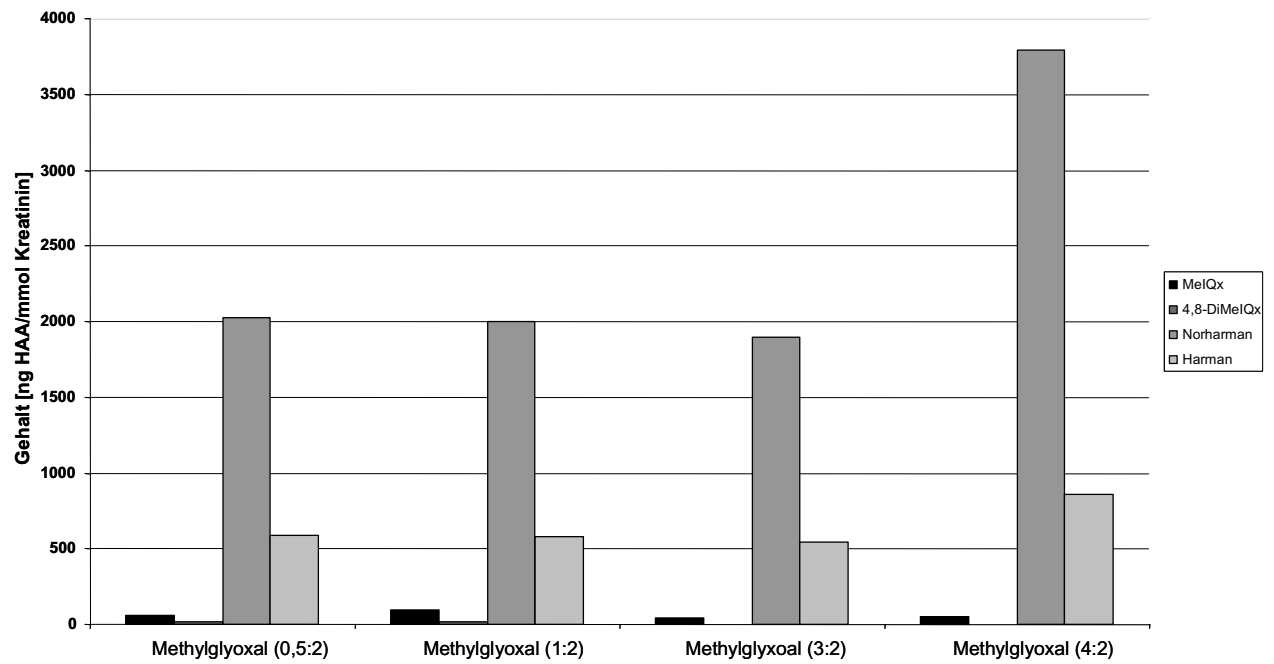
Eingesetzte Carbonylkomponenten: Glucose, Xylose, Methylglyoxal, Norfuraneol

Bestimmung: über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

Da über die Bildungswege dieser beiden Aminocarboline wenig bekannt ist, können über den Einfluss von verschiedenen zugesetzten Carbonylkomponenten nur ansatzweise Aussagen getroffen werden. Es wird versucht, die Bildung von Norharman und Harman über die Kon-

densationsreaktion von Tryptophan mit Formaldehyd bzw. Acetaldehyd zu klären. Auffällig ist, dass bereits in einem Blindversuch, ohne Zusatz jeglicher Carbonylkomponenten, erhebliche Mengen an Harman und Norharman im Vergleich zu den ebenfalls gebildeten Aminoimidazoazaarenen MeIQx und 4,8-DiMeIQx gebildet werden; der Zusatz von Glucose zu der Fleischextrakt-Avicel-Vormischung bewirkt eine leicht erhöhte Bildung von Harman und Norharman sowie von MeIQx und 4,8-DiMeIQx. Der Zusatz von Xylose und Norfuraneol hat dagegen eine Verminderung der Bildung der beiden Aminocarboline im Vergleich zum Blindversuch zur Folge. Dagegen erhöht ein Zusatz von Methylglyoxal im untersuchten Modellsystem auf Fleischextraktbasis die Bildung von Norharman deutlich. Bei einem Zusatz von Methylglyoxal im halbmolaren Verhältnis zu dem in der Vormischung enthaltenden Kreatin und Kreatinin, berechnet als Gesamtkreatinin, werden ebenso wie bei einem viertelmolaren Verhältnis und einem eineinhalbmolaren Verhältnis etwa 2000 ng Norharman pro mmol Gesamtkreatinin im Modellsystem gebildet (vgl. Abb. 3.62). In einem Modellsystem mit einem molaren Verhältnis von Methylglyoxal zum Gesamtkreatinin von 4:2 konnten 380 ng Norharman pro mmol Gesamtkreatinin bestimmt werden. Da die Bildung von Harman und Norharman in den eigenen Arbeiten ausschließlich in den untersuchten Modellen auf Fleischextraktbasis beobachtet werden konnte, kann kein Bezug auf Modelle mit Zusatz von Methylglyoxal ohne Fleischextrakt genommen werden. Aussagen über die Beeinflussung der Bildungsrate durch Zusatz von Methylglyoxal zu Modellen auf Fleischextraktbasis können daher nur bedingt getroffen werden.

Neben Harman und Norharman konnten in den beschriebenen wasserarmen Modellsystemen noch MeIQx und 4,8-DiMeIQx nachgewiesen werden. Auch in dem entsprechend gelagerten und erhitzten Modellsystem ohne weiteren Zusatz einer Carbonylkomponente konnten mit 60 ng pro mmol Gesamtkreatinin bereits relativ hohe Mengen an MeIQx nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.63). Dies ist bemerkenswert, da im Fleischextrakt und somit auch im Modellsystem keine reduzierenden Zucker, die für dessen Bildung gemäß der Bildungshypothese nach Jägerstad obligat sind, enthalten sind.

**Abbildung 3.62**

Bildung von HAAs in Avicel-Modellsystemen ( $a_w = 0,75$ , 10 d; 150 °C, 1 h)

Modellzusammensetzung:

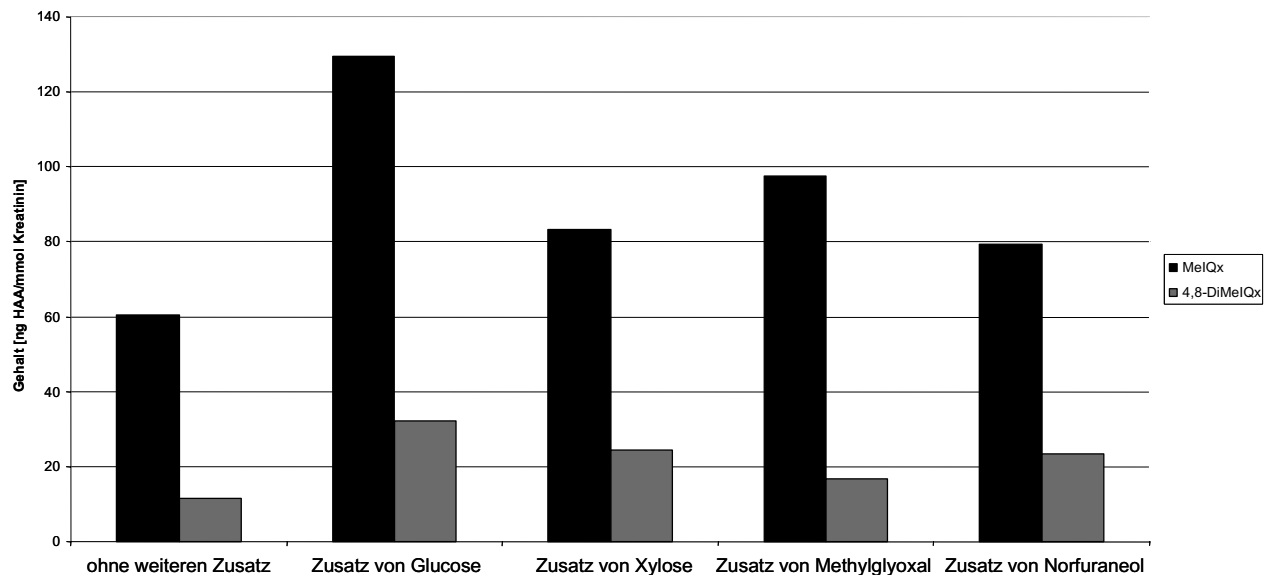
Anteil an Fleischextrakt mit best. Kreatiningehalt und Aminosäuren = konstant

Methylglyoxal = variable Komponente

Klammer-Termini = molare Verhältnisse von Methylglyoxal zu dem im zugesetzten Fleischextrakt enthaltenen Gesamtkreatinin

Bestimmung:

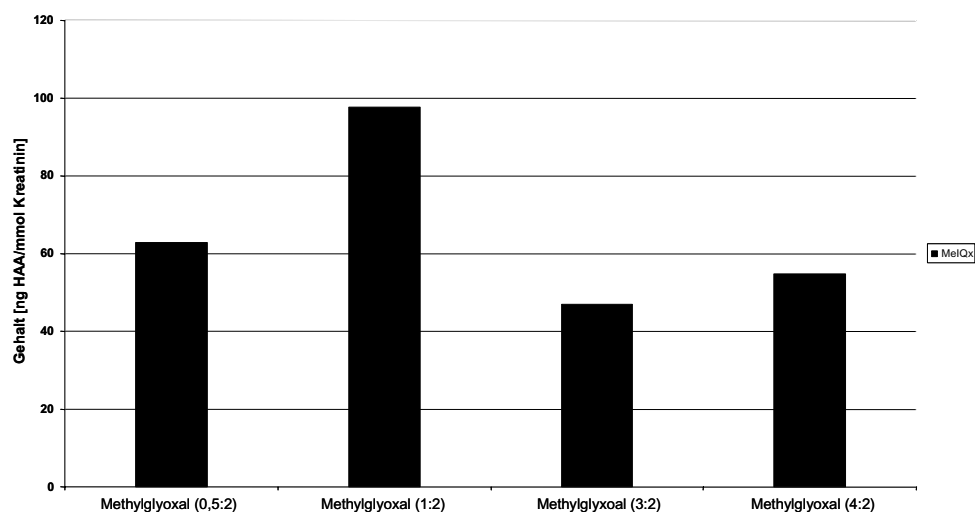
über HPLC-DAD an Supersphere RP-select B (Gradientenelu. Ammoniumformiatpuffer- $\text{CH}_3\text{CN}$ )

**Abbildung 3.63**

Bildung von HAAs in Avicel-Modellsystemen auf Basis von Fleischextrakt unter Zusatz von Glucose und weiteren Carbonylkomponenten ( $a_w = 0,75$ , 10 d; 150 °C, 1 h)

Nur auf die Gehalte an MeIQx und 4,8-DiMeIQx beschränkte Darstellung der Modellreihe in Abb. 3.62

Die Erkenntnisse aus glycin- und kreatininhaltigen Avicel-Modellsystemen mit Zusatz von Glucose, Xylose, Norfuraneol und Methylglyoxal im Verhältnis von 1:2:2 (Carbonylkomponente:Glycin:Kreatinin) (vgl. Abb. 3.40 und Abb.3.42) konnten somit auch für wasserarme Modellsysteme auf Fleischextraktbasis bestätigt werden, nicht aber der Einfluss steigender Mengen von Methylglyoxal auf die Bildung von HAAs (vgl. Abb. 3.62). Wie aus der Abbildung 3.63, in der der Übersichtlichkeit halber nur die bestimmten Gehalte an MeIQx und 4,8-DiMeIQx in Abhängigkeit von der Modellzusammensetzung abgebildet ist, hervorgeht, sind gegenüber dem Zusatz von Glucose die Mengen von gebildetem MeIQx bei einem Zusatz von Xylose oder Norfuraneol um etwa 35 %, bei einem Zusatz von Methylglyoxal um etwa 25 % reduziert. Diese Beobachtungen decken sich mit denen aus Modellen ohne Fleischextrakt in Kapitel 3.6.1. Anders als bei einem Methylglyoxal-Glycin-Kreatinin-Modellsystem konnte bei einem Methylglyoxal-Fleischextrakt-Modellsystem neben MeIQx auch noch 4,8-MeIQx bestimmt werden. Die Menge an gebildetem 4,8-DiMeIQx ändert sich bei den in Abbildung 3.63 dargestellten Modellen mit Carbonylzusatz nicht signifikant. Das mit Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellen ohne Fleischextrakt erzielte Ergebnis, dass steigende Mengen an Methylglyoxal die Bildung von MeIQx erhöhen (siehe Abb. 3.42 und 3.43 in Kapitel 3.6.3), konnte in den Fleischextrakt enthaltenden Modellsystemen nicht bestätigt werden, wie aus Abbildung 3.64 hervorgeht.



**Abbildung 3.64**

Bildung von MeIQx in Avicel-Modellsystemen auf Basis von Fleischextrakt unter Zusatz von Methylglyoxal in unterschiedlichem molarem Verhältnis zu dem aus dem Fleischextrakt stammenden Gesamtkreatinin

( $a_w = 0,75$ , 10 Tage; 150 °C, 1 h)

Nur auf die Gehalte an MeIQx beschränkte Darstellung der Modellreihe in Abbildung 3.63

Es ist erkennbar, dass die Bildung von MeIQx bei einem Molverhältnis von Methylglyoxal zu Gesamtkreatinin von 1:2 ein Maximum aufweist. Im Übrigen lässt sich in Abbildung 3.64 –

anders als im entsprechenden Modell ohne Fleischextrakt – keine Tendenz des Einflusses steigender Mengen von Methylglyoxal auf die Bildung von MeIQx erkennen.

### **3.9.3 Zusammenfassung der Erkenntnisse aus Avicel-Modellsystemen auf Fleischextraktbasis**

Aus den nur in geringem Maße durchgeführten Untersuchungen an Modellsystemen auf Fleischextrakt-Basis wird deutlich, dass komplexe Gemische von Aminosäuren, wie sie in Fleischextrakt vorkommen, die Art und Menge der gebildeten HAAs beeinflussen können, ohne dass ein klarer Bildungsmechanismus bekannt ist. Wie bei der Auswertung der Ergebnisse aus Glycin und Kreatinin enthaltenen Modellsystemen oftmals erwähnt, kann es sich bei dem von Jägerstad et al. [Lit. 112] postulierten Bildungsweg nur um einen möglichen Bildungsmechanismus handeln. Ohne Kenntnis der Bildungswege können die Ergebnisse aus Modellsystemen auf der Basis von Fleischextrakt nur deskriptiv beschrieben werden. Eine allgemeine Schlussfolgerung ist nicht möglich. Da in industriell aus Fleischextrakt und weiteren aromafördernden Zutaten wie z. B. Xylose hergestellten Reaktionsaromen des Maillard-Typs zur Erzielung eines Fleischgeschmackes in den eigenen Arbeiten kaum Mengen an HAAs, speziell der Aminocarboline Harman und Norharman, nachweisbaren waren, ist bei weiteren Versuchsreihen zu überprüfen, ob die Art des gewählten Modellsystems verändert werden muss.

## 4 Markierungsversuche

In den eigenen Arbeiten zeigte die Auswertung vieler wasserarmer Avicel-Modellsysteme, die neben Glycin und Kreatinin noch eine weitere Carbonylkomponenten enthielten, dass vielfach HAAs gebildet werden, deren Bildung aus den vorliegenden Edukten mit dem gängigen Bildungspostulat nach Jägerstad (vgl. Kapitel 1.1.3) nicht erklärt werden kann. Gemäß der „Las-Vegas-Hypothese“ wird MeIQx aus den Zwischenstufen 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd gebildet, 7,8-DiMeIQx aus den Zwischenstufen 2,3,5-Trimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd, 4,8-DiMeIQx entsteht dagegen aus 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und Acetaldehyd. Demnach sollte 4,8-DiMeIQx in Glycin enthaltenden Modellsystemen nicht entstehen, da aus Glycin im Rahmen des Streckerabbaus Formaldehyd entsteht. Bei Xylose bzw. Abbauprodukte der Xylose enthaltenden Glycin-Kreatinin-Modellsystemen jedoch konnte neben der Bildung von MeIQx und 7,8-DiMeIQx auch die Bildung größerer Mengen 4,8-DiMeIQx beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.6.1). Bei höheren Temperaturen (>150 °C) konnte Goldbeck [Lit. 69] die Bildung erhöhter Mengen an 4,8-DiMeIQx in diesen Modellsystemen feststellen. Weiterhin konnte in wasserarmen Avicel-Modellsystemen, die neben Xylose und Kreatinin ausschließlich Alanin als Aminosäurekomponente enthielten (vgl. Kapitel 3.7), in den eigenen Arbeiten die Bildung von (8)-MeIQx neben geringen Mengen an 4,8-DiMeIQx beobachtet werden. Nach der „Las-Vegas-Hypothese“ sollte in derartigen Modellsystemen neben MeIQx jedoch fast ausschließlich 4,8-DiMeIQx gebildet werden.

Anhand dieser in den eigenen Arbeiten gemachten Beobachtungen ist zu vermuten, dass es neben dem von Jägerstad postulierten auch noch alternative Bildungswege gibt.

In den eigenen Arbeiten wurde daher eine gaschromatographische Bestimmung von HAAs entwickelt (vgl. Kapitel 2.3.7.6), mit der Markierungs-Experimente ausgewertet werden können.

Bei Markierungs-Experimenten handelt es sich allgemein um Modellsysteme, bei denen als Modellkomponenten eine oder mehrere isotonenmarkierte Verbindungen eingesetzt werden.

Zur Auswertung der Markierungs-Experimente wurde in den eigenen Arbeiten die GC-MS mit Elektronenstoßionisation (EI) und positiver chemischer Ionisation (PCI) eingesetzt. Die HPLC-MS/MS ist prinzipiell zwar auch für die Auswertung solcher Experimente geeignet. Die Analyse mittels GC-MS hat jedoch mehrere Vorteile. Im EI-Modus bekommt man für jede Verbindung jeweils ein charakteristisches, fragmentreiches Spektrum, aus dem Aussagen über die Identität der betreffenden Verbindungen gemacht werden können. Die Fragmentierung ist zumeist unabhängig von der Matrix und der Menge der zu analysierenden Verbindungen.

dung. Durch Wechsel in den CI-Modus kann man die erhaltenen Ergebnisse nochmals absichern.

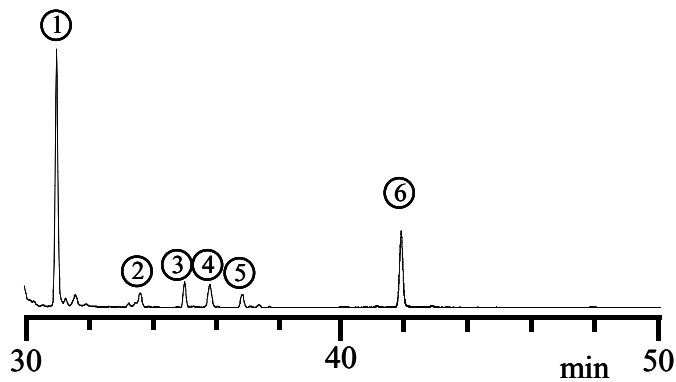
In den eigenen Arbeiten wurde vollmarkierte Glucose ( $6[^{13}\text{C}]$ -Glucose) zur Herstellung von Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen eingesetzt. Als Trägermatrix wurde nicht Avicel, sondern Seesand gewählt.

Den Einbau der im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten  $6[^{13}\text{C}]$ -Glucose-Fragmente in die aus den Modellsystemen isolierten und entsprechend derivatisierten (vgl. Kapitel 6.9.6) HAAs kann man sowohl mittels GC-MS-EI- (vgl. Arbeitsvorschriften, Kapitel 6.8.5.4) als auch mittels GC-MS-PCI-Analyse (mit Ammoniak als Reaktandgas, vgl. Kapitel 6.8.5.6) feststellen. Im Fragmentierungsmuster sieht man eine Massenverschiebung, den so genannten Massenshift. Er variiert, je nachdem welche Fragmente während der HAA-Bildung in das entsprechende Molekül eingebaut worden sind.

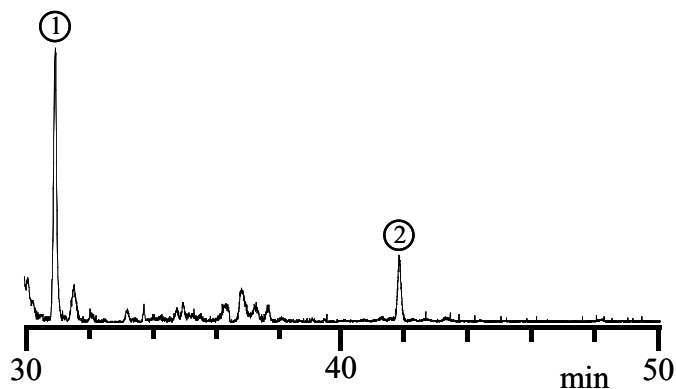
Zunächst wurde bei der Herstellung o. g. Modellsysteme  $6[^{13}\text{C}]$ -Glucose als ausschließliche Carbonylkomponente neben Glycin, Kreatinin und der Trägermatrix Seesand eingesetzt (Vollmarkierung, vgl. Kapitel 6.5.4). Durch mehrmaliges Aufschlännen, jeweils anschließende Gefriertrocknung und Feinvermalung wurde erreicht, dass sich die Modellkomponenten gleichmäßig auf die Trägermatrix verteilen. Anschließend wurden die Modellsysteme 6 Stunden für  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  in geschlossenen Glasgefäßen im Vakuumtrockenschrank erhitzt, analog zu Avicel-Modellsystemen aufgearbeitet (vgl. Kapitel 6.7) und in die entsprechenden tert.-Butyldimethylsilylderivate (TBDMS-Derivate) überführt (vgl. Kapitel 6.9.6). Neben dem inneren Standard 4,7,8-TriMeIQx konnte mittels GC-MS-EI (vgl. Abb. 4.1) und GC-MS-PCI (vgl. Abb. 4.2) eine weitere Verbindung detektiert werden, die eine zu dem entsprechenden TBDMS-Derivat von MeIQx lediglich um 7 Masseneinheiten höhere, aber sonst identische Fragmentierung zeigt. Im weiteren wird diese Verbindung als „MeIQx+7“ bezeichnet.

Nach Elektronenstoßionisation erkennt man auch bei MeIQx+7 die für TBDMS-Ether typische Abspaltung des tert.-Butylrestes aus dem radikalischen Molekülkation  $[\text{M}-57]^+$ . Das bei der Abspaltung entstehende Fragment erzielt zugleich die höchste Intensität (vgl. Kapitel 2.3.7.5). Wie aus Abbildung 4.3 zu sehen, ergibt sich für dieses Fragment ein Massenshift von 7 im Vergleich zum Fragment  $[\text{M}-57]^+$  des TBDMS-Ethers von nicht markiertem MeIQx mit  $m/e = 270$ . Die neben dem aus MeIQx + 7 stammenden Fragment  $m/e = 277$  detektierten Fragmente  $m/e = 278, 279, 280$  sind ebenfalls charakteristisch für einen TBDMS-Ether.



**Abbildung 4.1**

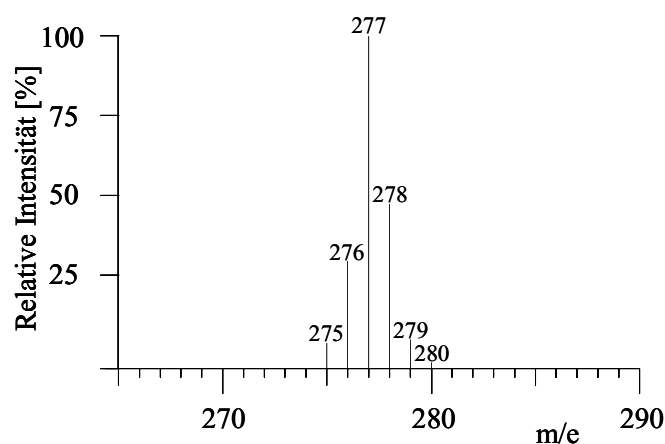
GC-Quadrupol-MS-Trennung (EI) eines Markierungs-Experimentes: Seesand-Modellsystem mit  $6^{13}\text{C}$ -Glucose, Kreatinin und Glycin (Zusammensetzung vgl. 6.5.4, Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. 6.9.6), Injektion (pulsed Split/splitless)  $1\mu\text{l}$ ; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. 6.8.5.4 Abschnitt I; Trägergas Helium 1,9 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionisationsenergie 70 eV, Ionenquelle 230 °C, Quadrupol 150 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus 265 u bis 295 u; MeIQx+7 (1);(2), (3), (4),(5) nicht zuzuordnen, 4,7,8-TriMeIQx (6)

**Abbildung 4.2**

GC-Quadrupol-MS-Trennung nach positiver chemischer Ionisation mit Ammoniak eines Markierungs-Experimentes: Seesand-Modellsystem mit  $6^{13}\text{C}$ -Glucose, Kreatinin und Glycin (Zusammensetzung vgl. 6.5.4, Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5), mit MTBSTFA silyliert (vgl. 6.9.6); Injektion (pulsed Split/splitless)  $1\mu\text{l}$ ; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i. Ø, 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. 6.8.5.6; Trägergas Helium 1,0 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionenquelle 250 °C, Quadrupol 106 °C, SEV 1576 V, Scan-Modus 320 u bis 350 u; MeIQx+7 (1), 4,7,8-TriMeIQx (2)

Sie ergeben sich im wesentlichen aus den schweren Isotopen des Siliciums. Die im Vergleich zu  $m/e = 277$  deutlich ausgeprägten Fragmente  $m/e = 275$  und  $m/e = 276$  deuten darauf hin, dass es neben MeIQx+7 eventuell noch in geringer Menge eine Verbindung mit einem Massenshift von 6 gegenüber MeIQx gibt.

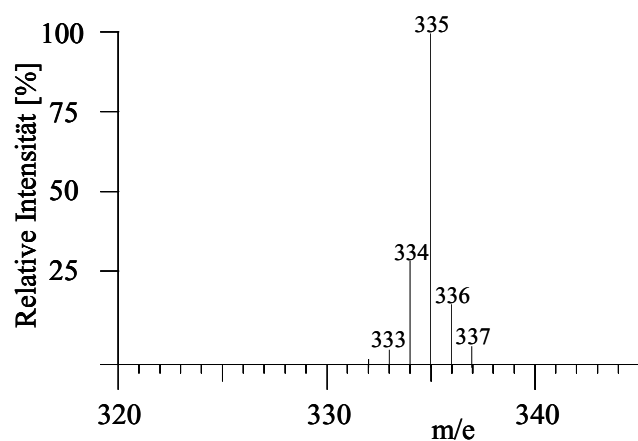
Eine Absicherung dieser Ergebnisse erfolgte mittels GC-MS-PCI mit Ammoniak. Nach Elektronenstoßionisation erkennt man auch bei MeIQx+7 das für TBDMS-Ether typische Quasimolekülkation  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (vgl. Kapitel 2.3.7.6).



**Abbildung 4.3**

Massenspektrum der TBDMS-Derivate von MeIQ<sub>x</sub>+7 (nach Silylierung mit MTBSTFA, vgl. 6.9.6), [M-57]<sup>+</sup>=277; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 4.1

Wie aus Abbildung 4.4 zu sehen, ergibt sich für dieses Fragment ein Massenshift von 7 im Vergleich zum Fragment [M+1]<sup>+</sup> des TBDMS-Ethers von unmarkiertem MeIQ<sub>x</sub> mit m/e = 328. Daneben können weitere, durch die Isotopenverteilung von Silicium entstehende Fragmente mit höherem m/e-Verhältnis detektiert werden. Die im Vergleich zu m/e = 335 relativ stark ausgeprägten Fragmente m/e = 333 und m/e = 334 deuten wiederum darauf hin, dass es neben MeIQ<sub>x</sub>+7 eventuell noch in geringer Menge eine Verbindung mit einem Massenshift von 6 gegenüber nicht markiertem MeIQ<sub>x</sub> gibt.



**Abbildung 4.4**

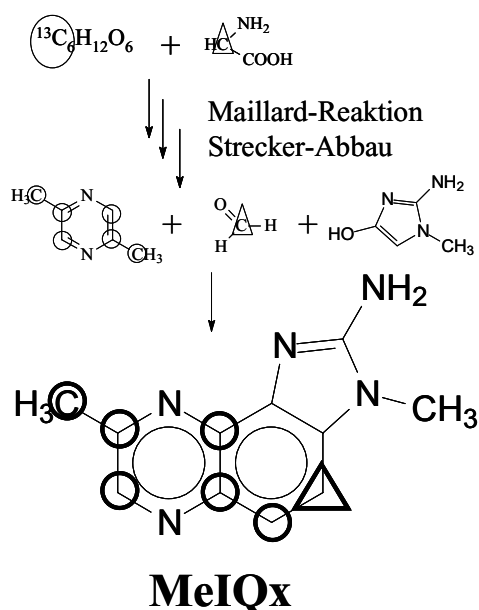
Massenspektrum von mit MTBSTFA silyliertem MeIQ<sub>x</sub>+7 (vgl. 6.9.6) nach positiver chemischer Ionisation (PCI) mit Ammoniak, [M+1]<sup>+</sup> = 335; GC- und MS-Parameter siehe Abb. 4.2

Nach dem von Jägerstad postulierten Bildungsweg (vgl. Kapitel 1.1.3) ist für MeIQ<sub>x</sub>, welches im Rahmen der Erhitzung gebildet wurde, lediglich ein Massenshift von 6 zu erwarten, wenn als Carbonylkomponente 6<sup>[13C]</sup>-Glucose eingesetzt wird. Aus Glucose entsteht nach der „Las-Vegas-Hypothese“ im Rahmen der Maillard-Reaktion 2,5-Dimethylpyrazin. Dieses reagiert im Rahmen einer Kondensationsreaktion mit Formaldehyd, aus dem Strecker-Abbau von

Glycin, und Kreatinin zu MeIQx. Lediglich das 2,5-Dimethylpyrazin bringt demnach  $^{13}\text{C}$ -markierte Kohlenstoffatome, maximal 6, in das MeIQx-Molekül ein. Abbildung 4.5 macht dies nochmals deutlich.

Die in den eigenen Arbeiten durchgeführten Markierungs-Experimente zeigen jedoch, dass aufgrund des Massenshiftes von 7 nicht nur durch das 2,5-Dimethylpyrazin  $^{13}\text{C}$ -markierte Kohlenstoffatome in das MeIQx-Molekül eingebracht werden. Demnach dürfte von der Aminosäure, respektive von dem Strecker-Aldehyd, kein Kohlenstoffatom in das MeIQx-Molekül eingebracht werden.

Denkbar ist auch, dass die im Rahmen der Maillard-Reaktion aus Glucose als sekundäre Abbauprodukte entstehenden so genannten  $\text{C}_3$  und  $\text{C}_4$ -Bruchstücke wie Methylglyoxal und 3-Hydroxyketobutyraldehyd miteinander im Rahmen einer Streckerreaktion unter Anwesenheit von Aminosäuren über die entsprechenden  $\alpha$ -Aminoketone zu 2-Ethenyl-5-Methylpyrazin kondensieren. Dieses Pyrazin könnte wiederum unter Aktivierung mit Kreatinin zu MeIQx kondensieren.



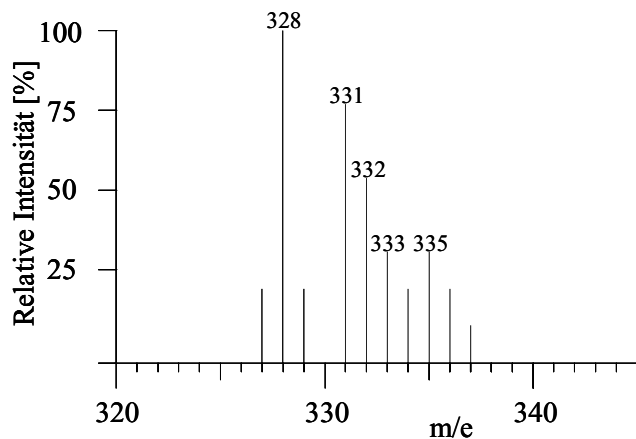
**Abbildung 4.5**

Schematische Darstellung der Bildung von MeIQx aus  $6[^{13}\text{C}]$ -Glucose, Glycin und Kreatinin; Kohlenstoffe, die aus der Glucose stammen, sind mit einem Kreis markiert, Kohlenstoffatome, die aus Glycin stammen, sind mit einem Dreieck markiert

In der organischen Chemie werden zur Klärung von Reaktionsmechanismen häufig Markierungs-Experimente angesetzt, bei denen 50 % markiertes Edukt und 50 % unmarkiertes Edukt eingesetzt werden. Je nach Reaktion gibt es dann für die markierten und unmarkierten Produkte eine statistische Verteilung. Würde die Bildung von MeIQx aus Glucose ausschließlich über entsprechende  $\text{C}_3$  und  $\text{C}_4$ -Fragmente erfolgen, so müssten die unterschiedlich markierten

Varianten von MeIQx mit dem Massenshift 0, 3, 4 und 7 zueinander (rein statistisch) im Verhältnis stehen wie 1:1:1:1.

In den eigenen Arbeiten konnte dies jedoch nicht nachvollzogen werden. Daraus könnte man vermuten, dass an der MeIQx-Bildung verschiedene Reaktionswege beteiligt sind.



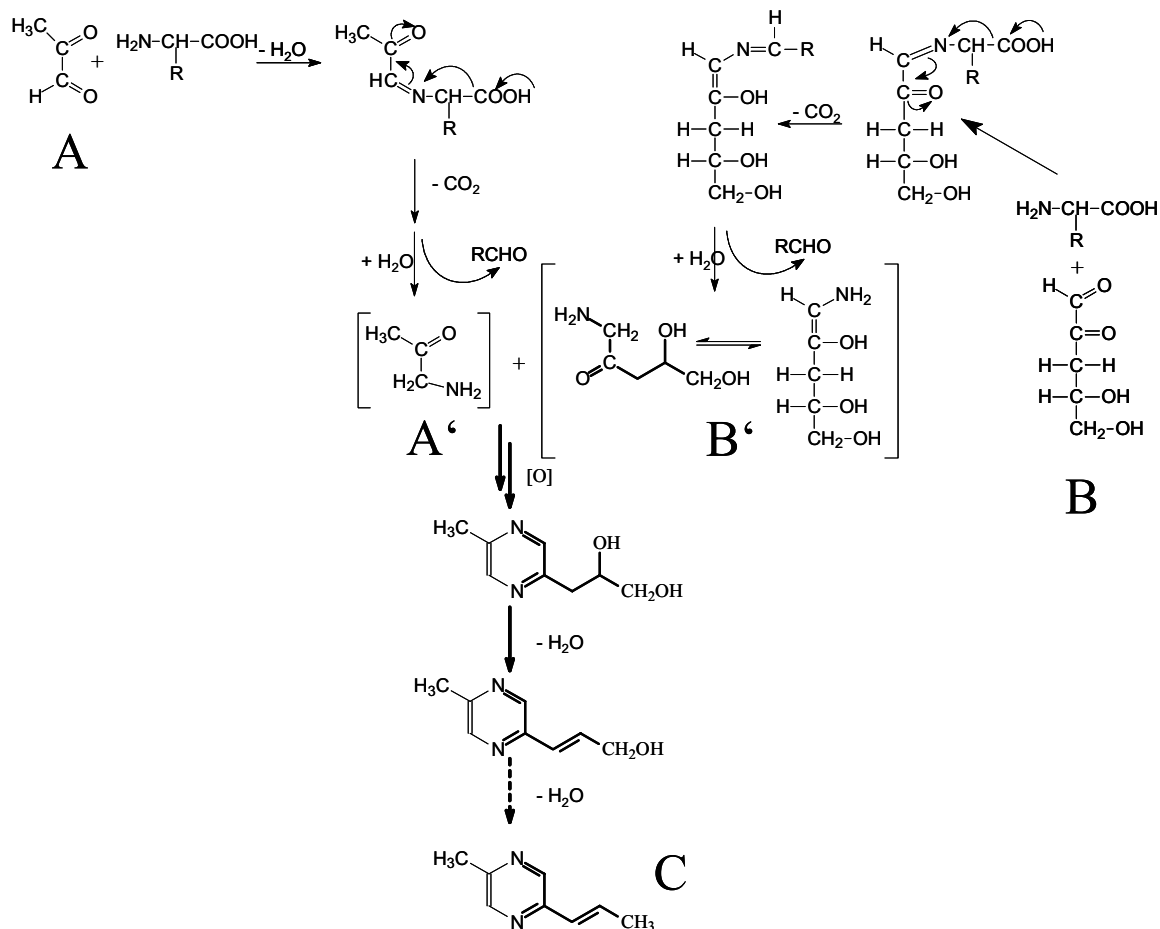
**Abbildung 4.6**

Auswertung eines Markierungs-Experimentes mit einem Seesand-Modellsystem (5 g) mit 6 [ $^{13}\text{C}$ ]-Glucose (1 mmol), Glucose (unmarkiert, 1 mmol), Kreatinin (2 mmol) und Glycin (2 mmol) (Aufarbeitung vgl. 6.7.2 bis 6.7.5): Massenspektrum der mit MTBSTFA umgesetzten aufgearbeiteten Extrakte (vgl. 6.9.6) nach positiver chemischer Ionisation (PCI) mit Ammoniak, jeweils  $[\text{M}+1]^+$  mit unterschiedlichem Anteil an  $^{13}\text{C}$ -markierten Kohlenstoffatomen; Injektion (pulsed Split/splitless) 1  $\mu\text{l}$ ; Trennung: 60 m Quarzkapillare DB-1 (100 % Dimethylsilikon), 0,25 mm i.  $\text{\O}$ , 0,1 mm Filmdicke; Temperaturprogramm vgl. 6.8.5.6; Trägergas Helium 1,0 ml/min, Gerätekombination vgl. 6.8.5.1, Ionenquelle 250  $^{\circ}\text{C}$ , Quadrupol 106  $^{\circ}\text{C}$ , SEV 1576 V, Scan-Modus 320 u bis 350 u

Aus den mittels GC-MS-PCI ermittelten Intensitäten der unterschiedlich markierten Quasimolekulationen ( $[\text{M}+1]^+$ ) von MeIQx kann, wie auch aus Abbildung 4.6 ersichtlich, kein aussagekräftiges Verhältnis abgeleitet werden.

Die in den eigenen Arbeiten durchgeführten Markierungs-Experimente deuten darauf hin, dass es neben dem von Jägerstad postulierten Bildungsweg („Las-Vegas-Hypothese“) weitere alternative Bildungswege geben könnte, bei denen lediglich der Stickstoff der beteiligten Aminosäuren nicht jedoch der entsprechende Streckeraldehyd in das Gerüst der gebildeten HAAs eingebaut wird.

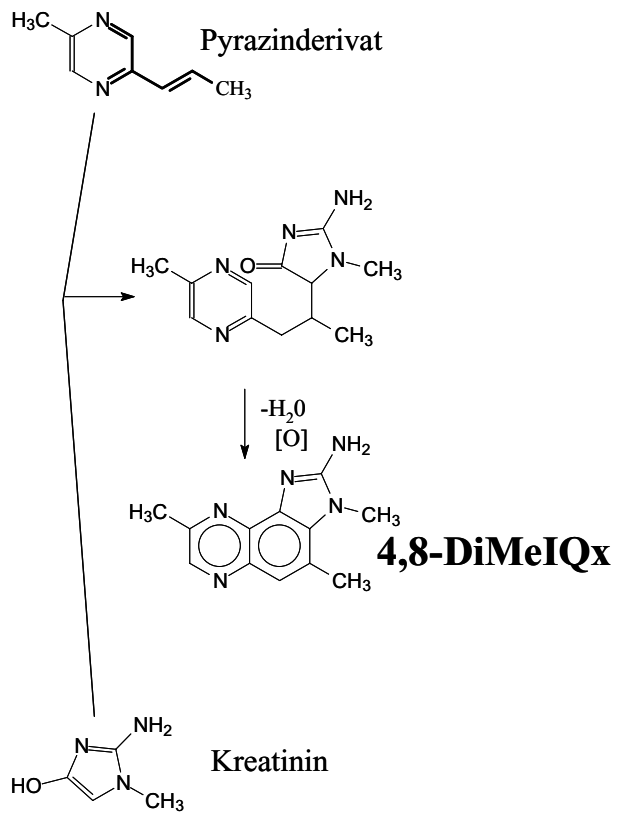
So könnte die Bildung von 4,8-DiMeIQx aus wasserarmen Avicel-Modellsystemen, die neben Xylose noch Glycin und Kreatinin enthalten, über ein Pyrazin-Derivat (Abb. 4.7, C) formuliert werden, das aus den entsprechenden  $\alpha$ -Aminoketonen (A', B') von Methylglyoxal (A) und dem 3-Desoxyoson der Xylose (B) gebildet wurde.

**Abbildung 4.7**

Hypothetische Bildung eines Pyrazinderivates C, das noch die intakte Kohlenstoffkette des im Rahmen der Maillard-Reaktion von Xylose gebildeten 3-Desoxyoson der Xylose erhält; Methylglyoxal ist ebenfalls ein Reaktionsprodukt der Xylose im Rahmen der Maillard-Reaktion

Dieses Pyrazin-Derivat könnte dann, wie in Abbildung 4.8 schematisch dargestellt, mit Kreatinin kondensieren und unter nachfolgender Wasserabspaltung und Cyclisierung zu 4,8-DiMeIQx reagieren. Um die Bildung von 4,8-DiMeIQx mit Xylose als Reaktionspartner über einen derartigen Bildungsweg zu verifizieren, müsste man wiederum mit markierten Edukten arbeiten. Bei dem Einsatz von vollmarkierter Xylose müssten demnach bis zu acht <sup>13</sup>C-Atome, je drei aus dem Methylglyoxal und fünf aus dem intakten Kohlenstoffgerüst des 3-Desoxyoson der Xylose, in das Zielmolekül 4,8-DiMeIQx eingebaut werden. Aufgrund sehr hoher Kosten für vollmarkierte Xylose wurde von diesem Markierungs-Experiment abgesehen.

Mit den durchgeführten Markierungs-Experimenten hat man eine Erklärung für die Bildung von 4,8-DiMeIQx aus Xylose, Glycin und Kreatinin zur Verfügung.



**Abbildung 4.8**

Möglicher Bildungsweg für 4,8-DiMeIQ<sub>x</sub> aus der Kondensation von Kreatinin mit einem komplexen Pyrazinderivat (vgl. Abb. 4.7)

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit baut vorwiegend auf dem von Jägerstad et al. [Lit. 112] im Jahr 1983 aufgestellten, bis heute akzeptierten Postulat für die Bildung von mutagenen heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) in Glucose, Aminosäuren und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen („Las-Vegas-Hypothese“) auf.

Gemäß diesem Bildungspostulat wird das HAA MeIQ<sub>x</sub> aus im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildetem 2,5-Dimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd, der aus dem Strecker-Abbau von Glycin hervorgeht, sowie 7,8-DiMeIQ<sub>x</sub> aus 2,3,5-Trimethylpyrazin, Kreatinin und Formaldehyd gebildet. Das in den eigenen Arbeiten beim Einsatz von Xylose wider Erwarten gebildete 4,8-DiMeIQ<sub>x</sub> entsteht dagegen – entsprechend der „Las-Vegas-Hypothese“ – aus 2,5-Dimethylpyrazin und Acetaldehyd.

Ziel der vorliegenden Arbeit im Sinne des vorbeugenden Verbraucherschutzes war, den noch unzureichend bekannten Einfluss von Pentosen und von Abbauprodukten aus der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen auf die Bildungsrate der HAAs zu klären.

Deshalb sollte zunächst der Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Bildung verschiedener Reaktionsprodukte der frühen Phase der Maillard-Reaktion von Pentosen untersucht werden, um mit diesen Erkenntnissen die Vorgänge bei der HAA-Bildung in Pentose enthaltenden Lebensmitteln wie Fleisch und Fleischextrakt in geeigneten Modellsystemen nachzustellen. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse können dazu beitragen, die Zusammensetzung und die Herstellungsbedingungen von Reaktionsaromen so festzulegen, dass die Mengen der dabei im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildeten HAAs möglichst gering gehalten werden.

### **Analysenmethoden zur Bestimmung der HAAs**

Um gesicherte Aussagen über die Bildung von HAAs in Modellsystemen zu gewinnen, mussten die bisher bestehenden Methoden der Spurenanalyse von HAAs auf die bestehende Problematik hin optimiert und neue, routinetaugliche Methoden erarbeitet werden.

Die Reinigung und Isolierung der in den verschiedenen Modellsystemen gebildeten HAAs verläuft dabei über eine Rohextraktion mit verdünnter Salzsäure (1 mol/l), eine Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und eine anschließende Fraktionierung an einer SCX-Festphase. Die in den so gereinigten Probelösungen enthaltenen HAAs wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) an einer chemisch gebundenen Umkehrphase (Merck Supersphere<sup>®</sup> RP-select B, 4 µm) über einen Gradienten aus Triethylammoniumphosphatpuffer (pH 2,8) oder Ammoniumformiatpuffer (pH 3,2) und Acetonitril getrennt

und mittels eines Diodenarray-Detektors sowie eines massenselektiven Detektors (ESI-MS/MS) identifiziert und bestimmt.

Eine Absicherung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte mittels mit Massenspektrometrie gekoppelter Kapillargaschromatographie (GC-MS) unter Verwendung eines Quadrupol-Massenspektrometers. Die in der Literatur vielfach beschriebenen Schwierigkeiten bei der gaschromatographischen Trennung der HAAs konnten durch geeignete Derivatisierung, Einsatz der chemischen Ionisation sowie Detektion im Single-Ion-Monitoring (SIM)-Modus minimiert werden. Als vorteilhaft hat sich erwiesen, HAAs in ihre tert.-Butyldimethylsilylderivate (TBDMS-Ether) zu überführen. Eine Bestimmung mittels GC-MS ist ohne weitere Reinigung der Silylierungsansätze möglich. Hierzu werden die in Acetonitril gelösten Proben mit einer Mischung von N-Methyl-N-tert.-Butyldimethylsilyltrifluoracetamid und tert.-Butyldimethylchlorsilan versetzt und anschließend inkubiert. Die dabei gebildeten Derivate der Aminoimidazochinoline bzw. -chinoxaline, der Pyridoimidazole MeAaC, Harman und Norharman sowie von PhIP können gaschromatographisch in einem Lauf getrennt und über ihre Fragmentmassen selektiv detektiert werden. Die Überprüfung wesentlicher Elemente einer Validierung wie Untersuchungen zur Präzision, Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit wurde anhand von Standardreihen mit definiert zugesetzter Matrix durchgeführt und zeigten die Routinetauglichkeit der von uns entwickelten Methode. Umfangreiche Analysen von dotierten Realproben (Lebensmittel und Reaktionsaromen) zeigen eine Linearität der Bestimmung im Konzentrationsbereich von 8 ng/g bis 8 µg/g Probe.

Der Nachweis der einzelnen HAAs erfolgte nach entsprechender Kalibrierung mit Referenzverbindungen über die jeweils charakteristische Fragmentierung des entsprechenden TBDMS-Ethers der HAAs; die Bestimmung erfolgte im SIM-Modus über stabile Fragmente der TBDMS-Ether (Elektronenstoßionisation ( $[M-57]^+$ ), durch positive chemische Ionisation (CI) mit Methan und Ammoniak als Reaktandgas ( $[M+H]^+$ ) sowie durch negative CI mit Ammoniak ( $[M-H]^-$ )). Im SCAN-Modus können silylierte Nebenprodukte mit erfasst werden. Die Robustheit dieser Methode zeigt sich u. a. in der Einsetzbarkeit verschiedener Säulentypen (DB-1, DB-5.625, RTX-5) sowie in der Haltbarkeit der Derivatisierungsansätze über mehrere Wochen. Eine Verkürzung der Aufarbeitung, die lediglich in einer salzsauren Extraktion mit anschließender Isolierung der HAAs durch eine alkalische Flüssig/Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan besteht, wurde bereits publiziert.

Ziel der Entwicklung dieser neuen vereinfachten GC-Bestimmungsmethode war nicht, an die Nachweisgrenze und Präzision der in der Routineanalytik ausschließlich eingesetzten HPLC-ESI-MS/MS-Methoden heranzukommen, sondern eine Methode zum schnellen Screening von



Proben auf HAAs zu entwickeln. So wurden in den eigenen Arbeiten bei der Untersuchung von Modellsystemen nur solche Proben einer der HPLC-Analytik vorgeschalteten umfangreichen Aufarbeitung zugeführt, die nachweisbare Mengen an HAAs enthielten, um so die Vielzahl der Modellsysteme in angemessener Zeit untersuchen zu können. Die Entwicklung dieser für den Nachweis und die Bestimmung von HAAs selektiven GC-MS-Methode ermöglichte zudem die Auswertung von Labeling-Experimenten.

### **Präparative Darstellung von Amadori-Verbindungen der Xylose**

Im Rahmen der geplanten Untersuchungen des Einflusses von Produkten der frühen Phase der Maillard-Reaktion auf die HAA-Bildung wurde zunächst versucht, die Amadori-Verbindung der Xylose als zentrale Zwischenstufe der Maillard-Reaktion herzustellen, um sie entsprechend in Modellsystemen einzusetzen. Auf diese Weise sollten unmittelbar während der Erhitzung der Modellsysteme gebildete Abbau-Produkte dieser Amadori-Verbindung zur Reaktion kommen.

In den eigenen Arbeiten gelang es wegen ihrer geringen Stabilität jedoch nicht, die für derartige Modellexperimente notwendige Menge der Xylose-Amadori-Verbindung präparativ darzustellen, da sie rasch zu Folgeprodukten weiterreagiert. 1-Alanyl-1-desoxy-xylulose, die Amadori-Verbindung aus Xylose und Alanin, konnte zwar in unter Rückfluss erhitzten methanolischen Xylose-Alanin-Reaktionsansätzen gaschromatographisch eindeutig nachgewiesen werden. Ihre Abtrennung unter Zuhilfenahme der Kationenaustauscher-Säulenchromatographie und der semipräparativen HPLC an chemisch gebundenen Aminophasen gelang jedoch nur bedingt. 1-Alanyl-1-desoxy-xylulose konnte lediglich mit mäßiger Reinheit im mg-Maßstab präparativ dargestellt werden, sodass eingehende Untersuchungen zum Einfluss der Reaktionsbedingungen auf den Abbau und die Weiterreaktion von Pentose-Amadoriverbindungen nicht möglich waren.

### **Untersuchung der Bildung von $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in wasserarmen Xylose-Aminosäure-Avicel-Modellsystemen in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen**

Bei den beim Abbau von Amadori-Verbindungen gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen handelt es sich um sehr reaktive Verbindungen, die als Marker für die fortschreitende Maillard-Reaktion angesehen werden können. Analytisch sind diese Zwischenstufen meist nicht direkt bestimmbar, da sie aufgrund ihrer Reaktivität schnell weiterreagieren. Eine geeignete Methode zur quantitativen Bestimmung dieser  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen stellt die Abfangreaktion mit o-Phenylendiamin (OPD) unter Bildung der entsprechenden Chinoxalinderivate dar. Die-

se können nach Silylierung mittels GC-MS-EI gaschromatographisch getrennt und bestimmt werden.

In den eigenen Arbeiten wurde erstmals versucht, auf diese Weise die Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in wasserarmen, Pentose enthaltenden Modellsystemen in Abhängigkeit von der Modellzusammensetzung und der jeweiligen Gleichgewichtsfeuchte zu erfassen. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass der Zusatz von OPD als Bestandteil von erhitzten wasserarmen Pentose-Aminosäure- und Pentose-Aminosäure-Kreatinin-Modellsystemen nicht geeignet ist, aus Pentosen intermediär gebildete  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen zu erfassen, da das OPD seinerseits mit der aus der betreffenden Pentose entstandenen 2-Pentosulose (Pentose) zu einer SCHIFF'schen Base reagiert. Diese SCHIFF'sche Base konnte nach Umsetzung mit Silylierungsreagenzien mittels GC-MS in zwei unterschiedlich silylierten Formen nachgewiesen werden. Die Chinoxalinderivate der zu erwartenden 1- bzw. 3-Desoxyosone der entsprechenden Pentosen konnten nach Silylierung mittels GC-MS-EI hingegen nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnte unabhängig davon, ob den Modellsystemen Kreatinin zugesetzt wurde oder nicht, die Bildung der jeweiligen als silylierte Chinoxalinderivate mittels GC-MS bestimmbaren Pentosone nachgewiesen werden. Die Bildung von Pentosonen ist in der Literatur kaum beschrieben. Die Bildung der Glykosone von Hexosen – auch in wasserarmen Modellsystemen – wurde hingegen vielfach, u. a. auch von Liedke [Lit. 159], beschrieben. Es wird ein radikalischer Reaktionsmechanismus unter Metall-Katalyse diskutiert.

### **Einfluss von Xylose und Xylose-Abbauprodukten auf die HAA-Bildung in wasserarmen Glycin-Kreatinin-Modellsystemen**

In den eigenen Arbeiten konnte die Beobachtung von Goldbeck [Lit. 69], dass beim Einsatz von Xylose in wasserarmen, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen deutlich weniger HAAs gebildet werden als beim Einsatz von Glucose, bestätigt werden. Auffällig war, dass in Modellsystemen, die aus Xylose, Glycin und Kreatinin zusammengesetzt waren, neben größeren Mengen an MeIQx und 7,8-DiMeIQx im Widerspruch zum Bildungspostulat von Jägerstad auch noch 4,8-DiMeIQx gebildet wurde.

Sowohl bei der Xylose als auch bei der Glucose konnte in den eigenen Arbeiten ein von ihrem Mengenanteil abhängiges ambivalentes Verhalten der eingesetzten reduzierenden Zucker in Bezug auf die HAA-Bildung festgestellt werden. Das Maximum der HAA-Bildung liegt dabei bei einem Molmengenverhältnis von 1:2:2 von reduzierendem Zucker zu Glycin und Kreatinin.

Von besonderem Interesse war, inwieweit im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildete Abbauprodukte der Xylose die Art und Menge der HAAs in wasserarmen Modellsystemen, die neben der Trägermatrix Avicel noch Glycin und Kreatinin enthalten, beeinflussen.

U. a. wurden wasserarme Avicel-Modellsysteme untersucht, die neben Glycin und Kreatinin noch Norfuraneol, ein Folgeprodukt des 1-Desoxyosons der Xylose, Furan-2-aldehyd, ein Folgeprodukt des 3-Desoxyosons der Xylose, Methylglyoxal, ein aus der Retroaldolkondensation des 3-Desoxyosons der Xylose im Rahmen der Maillard-Reaktion entstehendes Folgeprodukt, sowie Diacetyl, eine Verbindung des charakteristischen Aromastoffprofils von gebratenem Fleisch, enthielten.

Bei den Modellen unter Zusatz von Norfuraneol liegt das molmengenabhängige Maximum der HAA-Bildung ebenfalls bei einem Molverhältnis von 1:2:2 Norfuraneol zu Glycin und Kreatinin. Bei diesem Molmengenverhältnis wird in diesen Modellen mehr MeIQx, 4,8- und 7,8-DiMeIQx gebildet als in vergleichbar zusammengesetzten, Xylose enthaltenden Modellsystemen, wobei – anders als in den Modellen mit Glucose und Xylose – der Anteil von 4,8-DiMeIQx gegenüber dem Anteil von 7,8-DiMeIQx überwiegt. Dies ist mit keinem der bisher bekannten, postulierten Bildungswege für HAAs erklärbar.

Die Beobachtung, dass in den Norfuraneol enthaltenden Modellsystemen die gebildeten Mengen von HAAs mit steigendem Anteil an Norfuraneol abnehmen, ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass höhere Mengen an Norfuraneol die Bildung von HAAs infolge von zunehmenden Konkurrenzreaktionen zur HAA-Bildung in steigendem Maße blockieren.

Bei Modellen mit Furfural als Carbonylkomponente ist im Vergleich zu ansonsten identisch zusammengesetzten Glucose-Modellsystemen eine erhöhte Bildung an 4,8-DiMeIQx zu beobachten, die mit den bisher postulierten Bildungswegen von HAAs ebenfalls nicht zu erklären ist.

Bei den Modellen mit Methylglyoxal fällt auf, dass mit steigendem Molmengenverhältnis von Methylglyoxal zu Glycin und Kreatinin die gebildete Menge von MeIQx stetig zunimmt. Methylglyoxal kann aufgrund seiner  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur bei Anwesenheit von Aminosäuren im Rahmen der Strecker-Reaktion vergleichsweise rasch zu 2,5-Dimethylpyrazin reagieren. Im Sinne der „Las-Vegas-Hypothese“ kondensiert dieses mit Formaldehyd aus dem Strecker-Abbau von Glycin und Kreatinin zu MeIQx. Bei Avicel-Modellsystemen, die neben Glycin und Kreatinin ausschließlich Methylglyoxal enthielten, ist keine merkliche Bildung weiterer HAAs zu erkennen.

Bei den Modellen mit Diacetyl als ausschließliche Carbonylkomponente fällt auf, dass die Bildung von 7,8-DiMeIQx gegenüber der von MeIQx und 7,8-DiMeIQx bevorzugt ist.

Im Rahmen der eigenen Arbeiten wurden weiterhin Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Temperaturen auf die Bildung von HAAs, insbesondere von MeIQx, durchgeführt. Dabei wurden jeweils im Molmengenverhältnis von 1:2:2 verschiedene Carbonylkomponenten (Glucose, Xylose, Norfuraneol oder Methylglyoxal), Glycin und Kreatinin eingesetzt. Hinsichtlich der Reaktivität ist hier besonders das Modell mit Zusatz von Methylglyoxal hervorzuheben, das bei Erhitzung bei 100 °C für sechs Stunden etwa die doppelte Menge an MeIQx zu bilden vermag wie entsprechende Glucose oder Norfuraneol enthaltende Modelle. Werden die entsprechenden Modelle bei 180 °C für eine Stunde erhitzt, so fällt besonders bei den Xylose, Norfuraneol oder Methylglyoxal enthaltenden Modellen auf, dass die Menge an gebildetem 7,8-DiMeIQx die Menge an MeIQx übersteigt.

### **Einfluss von Xylose und Xylose-Abbauprodukten auf die HAA-Bildung in wasserarmen Glucose-Glycin-Kreatinin-Modellsystemen**

Es wurden Untersuchungen an wasserarmen Avicel-Modellsystemen vorgenommen, die neben Glucose, Glycin und Kreatinin noch Xylose oder Xylose-Abbauprodukte (Norfuraneol, Furan-2-aldehyd, Hydroxymethylfurfural, Methylglyoxal, Diacetyl, Furaneol und 2-Hydroxypropanon) enthielten. Dabei wurde jeweils ein Vergleich zu einem gleich behandelten, nur Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystem gezogen. Das Molmengenverhältnis der Mischung aus Glucose und der weiteren Carbonylkomponente zu Glycin und Kreatinin wurde entsprechend des Optimums der HAA-Bildung jeweils auf 1:2:2 eingestellt. Der Anteil dieser Carbonylkomponente in der Mischung mit Glucose wurde von 0 bis 100 mol-% variiert.

In Modellsystemen mit unterschiedlichen Anteilen von Xylose zeigte sich ein synergistischer Effekt zwischen Xylose und Glucose hinsichtlich der Bildung von MeIQx. Dieser Effekt ist in Modellen mit unterschiedlichen Anteilen von Norfuraneol, einem Maillard-Abbauprodukt der Xylose, und Furaneol noch stärker ausgeprägt.

Pearson [Lit. 222] formuliert die Bildung von HAAs über entsprechende Pyrazin-Radikalkationen. In der Literatur wird der die HAA-Bildung fördernde Einfluss von Verbindungen mit 4-Hydroxy-3(2H)-furanon-Struktur, zu der auch Norfuraneol und Furaneol zählen, auf die Bildung von Pyrazin-Radikalkationen diskutiert, was den in den eigenen Untersuchungen bestätigten Effekt erklären würde.

Aus Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Anteile an Methylglyoxal in den beschriebenen, Glucose, Glycin und Kreatinin enthaltenden Modellsystemen können keine einheitlichen Aussagen abgeleitet werden. Mit steigendem Anteil an Methylglyoxal in der Mischung ist zwar ein Rückgang der MeIQx-Bildung zu beobachten. Die gebildeten Mengen an 4,8- bzw. 7,8-DiMeIQx verändern sich jedoch nicht signifikant. Methylglyoxal kann sowohl aus Pentosen als auch aus Hexosen gebildet werden und wird als ein Precursor für die Bräunung von wässrigen Glucose- bzw. Xylose-Aminosäure-Reaktionsmischungen angesehen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von Hydroxymethylfurfural zu glucosehaltigen Modellsystemen die Art und Menge der gebildeten HAAs nicht beeinflusst.

Die Untersuchung von wasserarmen Reaktionsaromen des Maillard-Typs aus industriell hergestelltem Fleischextrakt im Labormaßstab zeigte, dass beim Einsatz von Xylose, Methylglyoxal oder Norfuraneol deutlich weniger MeIQx gebildet wird als beim Einsatz von Glucose. Die Bildung von 4,8-DiMeIQx, die in weitaus geringerem Maße erfolgte, änderte sich je nach verwendeter Carbonylkomponente nicht signifikant.

Insgesamt ergibt sich, dass es aufgrund der Vielzahl von möglichen Nebenreaktionen zur HAA-Bildung und dazu in Konkurrenz stehenden, meist zu niedermolekularen Bräunungsprodukten führenden Reaktionen schwierig ist, allgemein gültige Bildungswege für HAAs zu formulieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Gegenwart von Maillard-Abbauprodukten der Xylose anstelle von Xylose die HAA-Bildung beschleunigt wird. Beim Einsatz größerer Anteile an reduzierenden Zuckern wird dagegen die HAA-Bildung verlangsamt bzw. – offenbar infolge zunehmender Konkurrenzreaktionen – gänzlich unterdrückt. Andererseits konnten beim Einsatz von Xylose und Glucose synergistische Effekte zwischen den beiden Zuckern, die in Gegenwart von Xylose-Abbauprodukten noch verstärkt wurden beobachtet werden.

Aus der vorliegenden Arbeit ergeben sich jedoch mehrfach Hinweise darauf, dass der von Jägerstad et al. postulierte Bildungsweg („Las-Vegas-Hypothese“) nur eine vereinfachte Darstellung der tatsächlich bei der Bildung von HAAs ablaufenden Reaktionen ist. Umsetzungen mit vollmarkierter <sup>13</sup>C-Glucose mit Glycin in Gegenwart von Kreatinin haben in den eigenen Untersuchungen ergeben, dass bis zu sieben C-Atome in das HAA-Gerüst eingebaut werden können. Dies steht im Widerspruch zu der „Las-Vegas-Hypothese“ und deutet darauf hin, dass es weitere alternative Bildungswege geben muss, bei denen lediglich der Stickstoff der Aminosäure, nicht aber der entsprechende Strecker-Aldehyd in das Gerüst der gebildeten HAAs eingebaut wird. Ein entsprechender Vorschlag für einen derartigen alternativen Bil-

dungsweg für HAAs unter Beteiligung von Xylose wurde unterbreitet. So könnte die Bildung von 4,8-DiMeIQx aus Xylose und Glycin in Gegenwart von Kreatinin alternativ über reaktive Zwischenstufen mit Pyrazinstruktur, in die das intakte Kohlenstoffgerüst des intermediär entstandenen 3-Desoxyosons eingebaut ist, erfolgen. Um diesen Nebenweg der HAA-Bildung näher untersuchen zu können, sollten weitere Markierungs-Experimente mit  $^{13}\text{C}$ - bzw.  $^{15}\text{N}$ -markierten Edukten durchgeführt werden.

## 6 Arbeitsvorschriften

### 6.1 Allgemein verwendete Geräte und Chemikalien

#### 6.1.1 Allgemein verwendete Glasgeräte

GC-Gläser, 2 ml Inhalt, mit Schraubgewinde und Schraubdeckel mit PTFE beschichteter Dichtung (Firma Supelco, Deisenhofen, 854165)

Messkolben

Messzylinder

Mikroeinsätze: 0,1 ml insert 31,6 mm; clear glass; 15 mm tip; PK 100 (Supelco, SU860067)

„Sovirelgläser SVL-15“, 10 ml, mit Gewinde, Schraubkappe und PTFE-Dichtung (Sovirel, Levallois-Perret, Frankreich)

Vollpipetten

Zentrifugengläser, 80 ml mit Gewinde, Schraubkappe und PTFE-Dichtung (Willers, Münster)

#### 6.1.2 Allgemein verwendete Großgeräte

Gefriertrocknungsapparatur Lyovac GT 2 (AMSCO Finn-Asco, Hürth)

Kühlschrank, +4 °C (Liebherr, Ochsenhausen)

Tiefkühlschrank, -18 °C (AEG Hausgeräte AG, Nürnberg)

Umlufttrockenschrank, Modell FD (E2) (Firma Binder, Tuttlingen)

Vakuum-Rotationsverdampfer (Firma Büchi, Flawil/Schweiz, Modell Rotavapor R-114) mit Wasserbad (Büchi Modell B-480) und Vakuumpumpe (Firma Vacuubrand, Wertheim, Modell MZ C2 mit Ausbausatz AK/EK und Vakuumcontroller CVC 2 (Vaccubrand, Wertheim))

Zentrifuge, Modell Biofuge Primo (Heraeus-Christ, Osterode)

#### 6.1.3 Allgemein verwendete Kleingeräte

Aluminiumblockthermostat (Firma Barkey, Leopoldshöhe, Modell clinitherm, Typ vapotherm Analysenwaage 770 (Kern, Albstadt)

Analysenwaage Modell analytic (Sartorius, Göttingen)

Magnetrührer IKA-Combimag RCH (Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen)

pH-Meter mit Einstabmeßkette 766 (Knick, Berlin)

Reagenzglasschüttler, Typ Vibro-Fix VF2 (Janke & Kunkel, IKA-Werk, Staufen)

Transferpette, 10 µl - 100 µl, 25 µl - 250 µl, 100 µl - 1000 µl (Brand, Wertheim)

Ultraschallbad Modell Sonorex TK 52 (Bandelin, Berlin)

Zentrifuge, Modell Varifuge Typ 4120 (Heraeus-Christ, Osterode)

Zentrifugengläser, 80 ml mit Gewinde, Schraubkappe und PTFE-Dichtung (Willers, Münster)

#### 6.1.4 Allgemein verwendete Chemikalien und Gase

Acetonitril für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® (Merck, 1.00030.5000)

Dichlormethan (Hochschullieferung)

Helium 4.6 (Westfalen Nr. 26491673)

Methanol (Hochschullieferung, Einsatz für präparative Ansätze)

Methanol für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv® (Merck, 1.06007.5000)  
Natriumhydroxid (Acros 20505-010)  
Pyridin (Fluka Nr. 82704)  
Salzsäure, 36 % (Hochschullieferung)  
Stickstoff 4.8, rein (Firma Westfalen, Münster, Nr. 26491030)  
Stickstoff, technisch (Firma Westfalen, Münster, Nr. 26481030)  
verdünnte Lösungen und Säuren wurden, sofern es sich nicht um Maßlösungen handelt, die von der Firma Bernd Kraft, Duisburg geliefert wurden, selbst hergestellt  
Wasserstoff 5.0 (Westfalen Nr. 26491954)

## 6.2 Grundlegende Arbeitsschritte

### 6.2.1 Destillation und Lagerung von Lösungsmitteln

Die im Folgenden aufgezählten Lösungsmittel wurden jeweils kurz vor Verwendung mittels Destillation an einer Vigreuxkolonne gereinigt:

**Methanol** (Hochschullieferung), dest. über Kaliumhydroxid (Firma Merck, Darmstadt, Nr. 105033)

**Acetonitril** (Fluka, 33019; für Derivatisierungsansätze), dest. über Phosphorpentoxid (Fluka, 79612)

**tert. Butylmethylether (TBME)** (Firma Roth, 6746.3), dest. über Natrium (40 %ige Suspension in Öl (Firma Aldrich, Steinheim, Nr. 21,712–3))

**Chloroform** (Merck, 102442), dest. über Phosphorpentoxid

**Hexan** (Isomerengemisch) (Roth, 7782.2), dest. über Natrium

**Dichlormethan** (Acros, 1134-0025)

Die im Folgenden aufgezählten Lösungsmittel wurden speziell gelagert:

**Pyridin** (Fluka Nr. 82704) gelagert über Kaliumhydroxid (Fluka 60368)

**Isooctan** (Fluka Nr. 59050) gelagert über Molekularsieb mit 4 Å (Fluka 69838)

**Acetonitril** (destilliert, für Derivatisierungsansätze) gelagert über Molekularsieb mit 4 Å (Fluka 69838)

### 6.2.2 Desaktivierung von Glasgeräten

#### Geräte und Hilfsmittel:

Keine

#### Chemikalien und Reagenzien:

Dichlordimethylsilan (Fluka 40136)

Toluol (Acros 1768-0010)

Desaktivierungsreagenz: 5-10 %ige Lösung von Dichlordimethylsilan in Toluol (in einer Braunglasflasche aufbewahren)



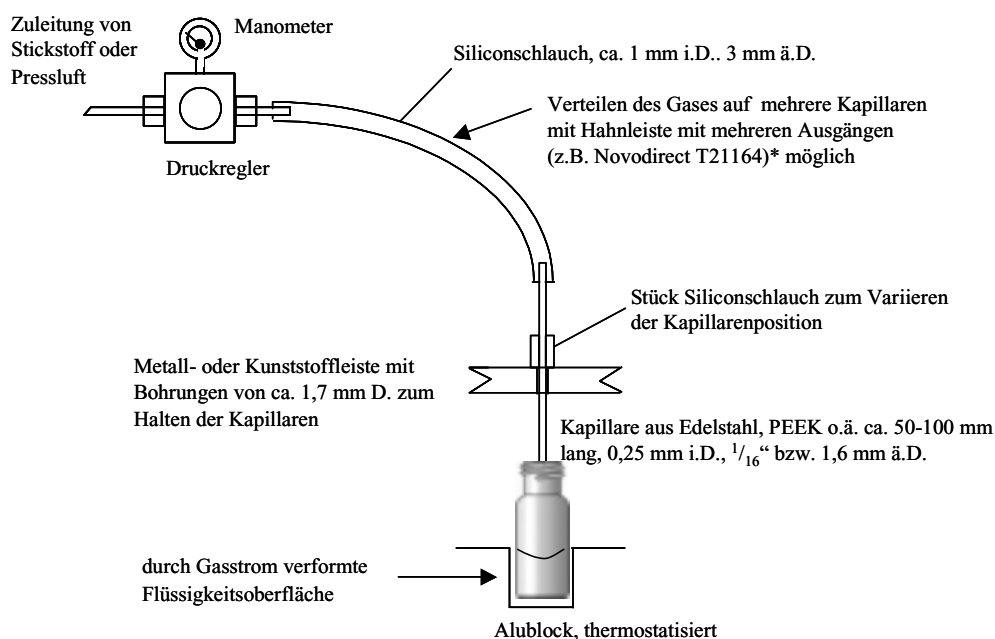
**Arbeitsweise:**

Das Glasgefäß vollständig mit dem Desaktivierungsreagenz füllen und das Reagenz 30 min lang einwirken lassen. Anschließend das Glasgefäß leeren und mit etwas Toluol und dann sofort mit Methanol nachspülen. Das Glasgefäß kann mit Wasser gespült werden und ist gebrauchsfertig.

Die Desaktivierung muss wiederholt werden, wenn sich beim Befüllen mit Wasser ein Meniskus bildet. Das Desaktivierungsreagenz kann mehrfach verwendet werden.

**6.2.3 Entfernung geringer Mengen an Lösungsmitteln aus Probelösungen**

Häufig müssen Lösungen in GC-Gläschen eingedampft werden. Die Lösungen werden dazu im Gasstrom (150 ml N<sub>2</sub>/min) unter Erwärmen der Gefäße in einem Aluminiumblockthermostaten mit 6 nebeneinander angeordneten und in der Höhe verstellbaren und in der Höhe verstellbaren Stahlnadeln (0,25 mm i. Ø.) eingedampft (schematische Darstellung der Apparatur in Abb. 6.1)

**Abbildung 6.1**

Schematische Darstellung einer Vorrichtung zum Entfernen von Lösungsmitteln nach E. Schulte, Universität Münster

Die ausreichende Trocknung, speziell von Probelösungen, die Spuren von Wasser enthalten, kann überprüft werden, indem man das Gefäß nach einer angemessenen Trocknungszeit wiegt. Man wiederholt die Trocknung und wiegt erneut. Die Differenz zwischen den Wägungen sollte 1 mg nicht überschreiten, ansonsten ist die Trocknung fortzusetzen. Die Temperatur des Heizblocks sollte je nach Lösungsmittel 50 °C (Methanol, Acetonitril) bis 70 °C (Methanol mit geringem Wasseranteil) nicht übersteigen. Das Eindampfen im Gasstrom muss in einem Abzug mit hoher Absaugleistung erfolgen, da sonst u. U. Explosionsgefahr besteht.

## 6.3 Präparative Darstellung von Amadori-Verbindungen der Xylose

### 6.3.1 Reaktionsführung bei präparativen Modellansätzen

#### Geräte und Hilfsmittel:

Dreihalskolben, 500 ml

Intensivkühler (Firma Willers, Münster) mit aufgesetztem Gärröhrchen

Heizpilz Gr. 6 (Firma Haraeus-Wittmann, Heidelberg)

Temperaturregler, microprozessorgesteuert mit Temperaturfühler (Eigenbau)

Druckminderer (Firma Druva, Essen) mit nachgeschaltetem Nadelventil und Flussmesser

Edelstahlkapillare (200 mm, 1 mm i.Ø.)

Blauband-Faltenfilter (Macherey&Nagel, Düren)

#### Chemikalien und Reagenzien:

D-(+)-Xylose (Fluka, 95729)

Alanin (Fluka, 05129)

Natriumdisulfit (Acros, 41958-0010)

Paraffin (Fluka, 76234)

#### Aufbau der Reaktionsapparatur/Ansatz der Reaktionsmischung

Eine standardmäßig benutzte Reaktionsapparatur besteht aus einem Dreihalskolben (500 ml) mit aufgesetztem Intensivkühler, einem Magnetrührer, einem Heizpilz (Steuerung der Heizleistung über einen in die Reaktionslösung eintauchenden Temperaturfühler eines elektronischen Reglers) und einer Regeleinheit für die Zudosierung von Spülgasen in die geschlossene Reaktionsapparatur (ein Gärröhrchen gefüllt mit Paraffin dient als Druckausgleich, Spülgase können durch eine Edelstahlkapillare direkt in die Lösung eingeleitet werden). 70 mmol Xylose (10,5 g), 35 mmol Aminosäure (z. B. 3,15 g Alanin) und 2,5 g Natriumdisulfit werden in den Dreihalskolben eingewogen. Dem Gemenge wird 250 ml Methanol (frisch über KOH destilliert) hinzugefügt. In die gesamte Apparatur wird während der Rühr-, der Erhitzungs- und der Abkühlphase ständig Stickstoff (technische Qualität, 150 ml/min) eingeleitet.

#### Reaktionsführung

Rührphase:	10 min, Raumtemperatur, hohe Rührgeschwindigkeit, Stickstoffatmosphäre
Erhitzungsphase:	in 10 min auf 67 °C
Haltephase:	30 min bei 67 °C, mäßige Rührgeschwindigkeit
Abkühlphase:	mittels Eis/Wassergemisch in 5 min auf 10 °C, hohe Rührgeschwindigkeit

### 6.3.2 Aufarbeitung der Reaktionsmischung zu Rohpräparaten

Die abgekühlte Reaktionsmischung wird durch einen Faltenfilter (Blauband) abfiltriert, das Filtrat in einen Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei maximal 35 °C Wasserbadtemperatur zu einem sirupösen Rückstand, dem Rohpräparat (etwa 15 ml), eingeengt.

### 6.3.3 Weitere Arbeitsschritte zu Isolierung und Reinigung von Amadori-Verbindungen der Xylose

#### 6.3.3.1 Durchführung von Tüpfelreaktionen als Screening auf Amadori-Verbindungen

##### Geräte und Hilfsmittel

Tüpfelplatte, Porzellan (Firma Willers, Münster)

##### Chemikalien und Reagenzien

Reagenz A: 0,2 g Ninhydrin (Merck 1.06762.0100) in 95 ml n-Butanol und 5 ml Essigsäure (10 %)

Reagenz B: 0,5 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Fluka 93140) (in 100 ml Natronlauge (0,5 mol/l))

##### Arbeitsweise

Jeweils 20 µl der entsprechenden Probelösung wird auf zwei Tüpfelplatten mit 100 µl der jeweiligen Reagenzlösung vermischt.

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

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

#### 6.3.3.2 Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an Merck-Lewatit-Kationenaustauschern

##### Geräte und Hilfsmittel

Chromatographiesäule mit Lösungsmittelreservoir, Ø 12 mm (Firma Willers, Münster)  
Glaswatte

Fraktionssammler L-5260 (Merck, Darmstadt)

##### Chemikalien und Reagenzien

Kationenaustauscherharz Lewatit S 1080, nicht mehr im Handel (Merck, Darmstadt)

Salzsäure, 3 M

bidest. Wasser

Essigsäure 99-100 %, Eisessig (Hochschullieferung)

Trichloressigsäure (Merck, 1.00807.0250), wässrige Lösung, 0,2 M

Ammoniaklösung, wässrig 1 M

##### Vorbereitung der Kationenaustauschersäule

Die Chromatographiesäule wird kurz über dem Hahn mit einem kleinen Wattepfropf versehen. Das in Wasser gequollene Lewatit-Harz (S 1080) wird bis zu einer Höhe von ca. 150 mm in die Chromatographiesäule geschwemmt. Nach dem Absetzen des Harzes wird es durch einen abschließenden Wattepfropf gegen Aufwirbelungen geschützt. Das Harz wird mit 50 ml Salzsäure, 3 M, regeneriert. Man wäscht mit Wasser, bis die ablaufende Waschflüssigkeit pH-

neutral ist. Die Säule kann nun zur Reinigung und Isolierung des Rohpräparates eingesetzt werden.

### **Säulenchromatographie**

Die wässrige Lösung des Rohpräparates aus 6.3.2 wird in einen Spitzkolben überführt und am Rotationsverdampfer bei maximal 35 °C Wasserbadtemperatur zu einem sirupösen Rückstand (15 ml) eingengt. Man versetzt mit 3 ml Eisessig und verdünnt mit 30 ml Wasser. Zur weiteren Aufreinigung wird die Lösung auf eine frisch regenerierte Kationenaustauschersäule (Merck Lewatit® S1080, 30 cm Füllhöhe bei 2 cm Innendurchmesser der Säule) gegeben, mit 2000 ml bidest. Wasser zuckerfrei gewaschen und dann mit 1,5 l verdünnter Trichloressigsäure bzw. wässriger Ammoniaklösung eluiert. Das Eluat wird mit einem Fraktionssammler in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen.

Durch Tüpfelreaktionen (vgl. Kapitel 6.3.3.1) werden Fraktionen mit Amadori-Verbindungen selektiert, vereinigt, bei 30 °C am Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand anschließend bei -18 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet.

### **6.3.3.3 Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an Fractogel-Kationenaustauschern mit nachgeschaltetem RI-Detektor**

#### **Geräte und Hilfsmittel**

Glasrohr, 100 mm, 6,5 mm i. Ø.; 2 mm Wandstärke

Glasfritten, 2 mm, 6,5 mm Ø

diverse GPC-Fittings (Firma Chromatographiehandel Müller)

Splitventil für die Flüssigchromatographie (Firma Chromatographiehandel Müller)

#### **Chemikalien und Reagenzien**

Natriumchlorid (Acros 20779-010)

Citronensäure (Merck 1.00244.0500)

bidest. Wasser

Natronlauge, 0,2 M

Kationenaustauscher A: Fractogel®-EMD SE Hicap (M), Lagerung als Suspension in 20 %iger Ethanollösung (Merck, Darmstadt)

Kationenaustauscher B: Fractogel®-EMD SO<sub>3</sub><sup>-</sup> (M), Lagerung als Suspension in 20 %iger Ethanollösung (Merck, Darmstadt)

#### **Arbeitsweise**

Die wässrige Lösung des Rohpräparates aus Kapitel 6.3.2 wird in Mengen von 500 µl bis 500 ml pro Chromatographielauf auf die Säule gegeben.

#### **Flüssigkeitschromatographie**

Geräteanordnung:	Pumpe:	L-6200 (Merck, Darmstadt)
	Detektor:	Differenzial-Refraktometer (Knauer, Bad Homburg); durch ein Splitventil gesteuert fließt durch die Referenzzelle eine identische Menge

	an Eluent mit identischer Zusammensetzung wie auf die Säule aufgegeben wird.
Datenaufzeichnung:	Turbochrom 6.1.0.2 (Perkin Elmer, Rodgau) über A/D-Interfaces
Säule:	Einfüllung von etwa 2,5 ml Kationenaustauscher A bzw. B (entspricht ca. 6 cm Füllhöhe), jeweils mit Glasfritten abschließen, mittels GPC-Fittings mit Pumpen- und Detektoreinheit verbinden.
Säulentemperatur:	20 °C
Regeneration:	von Kationenaust. A: mit NaCl-Lsg., 1M, und Citronensäurelsg., 20 mM, eingestellt auf pH 4,7 von Kationenaust. B: mit NaCl-Lsg., 1M
Eluent:	variabler Gradient aus bidest. H <sub>2</sub> O/NaCl-Lsg., 2 M
Fluss:	1 ml/min (konstant über die Laufzeit)

### 6.3.3.4 Reinigung und Isolierung des Rohpräparates an chemisch gebundenen Aminophasen mittels HPLC

#### Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril für die Flüssigkeitschromatographie  
bidest. Wasser

#### Arbeitsweise

Die wässrige Lösung des Rohpräparates aus Kapitel 6.3.2 wird in Mengen von je 20 µl pro HPLC-Lauf auf die Säule gegeben. Mittels Fraktionssammler werden gelöste Verbindungen, die am RI-Detektor ein Signal erzeugen, in einzelne Fraktionen getrennt. Das in diesen enthaltene Lösungsmittel wird am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 35 °C entfernt, die verbliebene wässrige Lösung bei -18 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird zur GC-MS nach Oximierung und Silylierung eingesetzt (vgl. Kapitel 6.8.5.3).

#### HPLC-Trennbedingungen

Geräteanordnung:	Pumpe:	L-7100 (Merck, Darmstadt)
	Injektion:	L-6200 Autosampler (Merck, Darmstadt)
Detektor:	Differenzial-Refraktometer	(Knauer, Bad Homburg)
	Datenaufzeichnung:	Turbochrom 6.1.0.2 (Perkin Elmer, Rodgau) über A/D-Interfaces
Säule:	LiChrospher 100 NH <sub>2</sub> (250 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm)	(Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur:	20 °C	
Eluent:	isokratisch	
	Mobile Phase:	Acetonitril/bidest Wasser 80+20 (v/v)
Fluss:	1 ml/min (konstant über die Laufzeit)	
Fraktionierung:	Fraction Collector L-5260 (programmierbar, mit dem RI-Detektor gekoppelt)	(Merck, Darmstadt)

## 6.4 Präparative Darstellung des 3-Desoxyosons der Xylose nach Kato

### Geräte und Hilfsmittel

Rundkolben, 500 ml

Rückflusskühler

beiheizbarer Magnetrührer

Glycerinbad mit Kontaktthermometer (IKA-Werk, Staufen)

Chromatographiesäule mit Lösungsmittelreservoir, Ø 20 mm

### Chemikalien und Reagenzien

D-(+)-Xylose (Fluka, 95729)

n-Butylamin (Fluka, 19482)

Methanol, frisch destilliert

Aktivkohle

Cellulosepulver für die Säulenchromatographie, MN 100 (Macherey & Nagel, Düren)

Essigsäureethylester (Merck, 1.09623.2504)

Ethanol (Hochschullieferung)

dest. Wasser

Elutionsmittel für Cellulose-Säulenchromatographie:

Essigsäureethylester/Ethanol/dest. Wasser (6 + 3 + 1) (v/v/v)

### Arbeitsweise

#### Vorbereitung der Cellulose-Säule:

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

#### Reaktionsansatz und Isolierung des 3-Desoxyosons:

27 g Xylose und 11 g n-Butylamin werden in 20 ml Methanol im Rundkolben im Glycerinbad unter Rückfluss auf 65 °C erhitzt (innerhalb 20 min). Man lässt abkühlen auf Raumtemperatur und gibt 10 ml Eisessig hinzu. Anschließend erhitzt man erneut für 7 min auf 55 °C im Glycerinbad. Man verdünnt die tiefbraune Reaktionsmischung mit Wasser auf ca. 280 ml, kühlt diese mittels Eisbad auf 0 °C ab und gibt zur Entfärbung 5 g Aktivkohle hinzu. Der Reaktionsansatz wird über Nacht gerührt. Anschließend werden feste Bestandteile über eine Mikrofiltrationsapparatur abgesaugt. Dieser Entfärbungsschritt wird noch weitere 7 x wiederholt, ehe man eine schwach gelbe Flüssigkeit erhält.

Um das überschüssige n-Butylamin zu entfernen, wird diese auf eine zuvor konditionierte Lewatit S 1080 Kationenaustauschersäule gegeben (vgl. Kapitel 6.3.3.2), wobei das Eluat in

einem Rundkolben aufgefangen wird. Man spült noch zusätzlich mit 30 ml Wasser nach und engt das gesammelte Eluat am Vakuum-Rotationsverdampfer bei 35 °C zum Sirup ein.

Der Sirup wird in 20 ml Ethanol (96 %) gelöst und mit 5 g Cellulosepulver vermischt. Man dampft das Lösungsmittel im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur ab und gibt das Cellulosepulver, auf dem nun das Reaktionsgemisch aufgebracht ist, auf die Cellulose-Säule. Man eluiert mit insgesamt 500 ml Elutionsmittel (siehe oben) und fängt Fraktionen zu 20 ml auf. Die einzelnen Fraktionen werden gaschromatographisch auf das 3-Desoxyoson unter Kapitel 6.8.5.2 untersucht; die genügend reinen Fraktionen vereint werden und nach dem Entfernen des Lösungsmittels gefriergetrocknet.

## 6.5 Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM)

### Geräte und Hilfsmittel:

Mörser und Pistill

Prüfsieb 0,8 mm

Parafilm

Bechergläser, 600 ml, hohe Form

Batch-Mühle Modell A10 (IKA-Werk, Staufen)

Kryostat (Firma Haake)

### Chemikalien und Reagenzien:

Kreatinin (Fluka, 27910)

Glycin (Fluka, 50046)

L-Alanin (Fluka, 05129)

Fleischextrakt, amerikanisch (Produktionsprobe der Firma Symrise, Holzminden)

mikrokristalline Cellulose (Avicel), ca. 0,02 mm (Serva 14205.02)

Stickstoff, flüssig

### Arbeitsweise:

#### Herstellung von Avicel-Kreatinin-Aminosäure-Modellvormischungen:

Zur Herstellung einer Modellvormischung wird Avicel sowie Kreatinin und Glycin bzw. Alanin im äquimolaren Verhältnis in ein Becherglas eingewogen und unter Zugabe der achtfachen Menge an Wasser in bezug auf die eingesetzte Avicelmenge zu einer breiartigen Konsistenz suspendiert. Die Suspension nach intensivem Verrühren mit Parafilm abdichten und bei -18 °C einfrieren. Das Modellsystem mindestens 4 h oder über Nacht einfrieren, anschließend gefriertrocknen. Nach Beendigung der Trocknung die Mischung mörsern und noch verbliebene Feuchtigkeitsreste durch Gefriertrocknung entfernen. Die so erhaltenen Vormischungen stets verschlossen bei -18 °C lagern.

#### Herstellung von Avicel-Fleischextrakt-Modellvormischungen:

Jeweils gleiche Mengen an Avicel sowie Fleischextrakt werden in ein Becherglas eingewogen und unter Zugabe der fünffachen Menge an Wasser in bezug auf die eingesetzte Avicelmenge zu einer breiartigen Konsistenz suspendiert. Nach intensivem Verrühren die Suspension mit Parafilm abdichten und bei -18 °C einfrieren. Das Modellsystem mindestens 4 h oder über

Nacht einfrieren, anschließend gefriertrocknen. Nach Beendigung der Trocknung die Mischung mörsern und noch verbliebene Feuchtigkeitsreste durch Gefriertrocknung entfernen. Da die getrocknete Vormischung mit einem Mörser nicht fein genug vermahlen werden kann, muss sie der sogenannten Kryo-Vermahlung zugeführt werden. Dabei wird das Probengut durch Zugabe von flüssigem Stickstoff schlagartig tiefgefroren und portionsweise in einer gekühlten Batch-Mühle fein vermahlen. Die so erhaltene Vormischung ist unbedingt verschlossen und bei -18 °C aufzubewahren, da sie sehr hygroskopisch ist.

#### Zugabe weiterer Modellkomponenten zu den Vormischungen:

Zu der jeweiligen Vormischung werden die für das entsprechende Modellsystem benötigten weiteren Modellkomponenten in Form von wässrigen Lösungen hinzugegeben, die Mischungen bis zur breiigen Konsistenz suspendiert und wie zuvor beschrieben gefriergetrocknet. Um eine einheitliche Körnung zu erreichen, werden die Modellmischungen durch ein Prüfsieb verrieben.

### **6.5.1 Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) zur Bestimmung des Bräunungsverhaltens**

#### **Weitere Modellkomponenten**

D-(+)-Xylose (Fluka, 95729)

#### **Zusammensetzung:**

Messreihe 1:            molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: Kreatinin = 0,5:1:1  
                             molares Verhältnis von D-Xylose:L-Alanin: Kreatinin = 0,5:1:1  
                             molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: = 0,5:1  
                             7,5 g Avicel je g Xylose

Messreihe 2:            molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: Kreatinin = 0,5:1:1  
                             molares Verhältnis von D-Xylose:L-Alanin: Kreatinin = 0,5:1:1  
                             molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: = 0,5:1  
                             10 g Avicel je g Xylose

### **6.5.2 Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) mit OPD als Trapping-Reagenz**

#### **Weitere Modellkomponenten**

ortho-Phenylendiamin (Fluka, 78429)

1,8-Diaminonaphthalin (Fluka, 33170)

D-(+)-Xylose (Fluka, 95729)

D-(+)-Glucose (Merck, 1.08337.1000)

D-(–)-Arabinose (Fluka, 10850)

D-(–)-Ribose (Fluka, 83860)

#### **Zusammensetzung**

Pro mmol an Hexose bzw. Pentose wird 1g Avicel in den Modellsystemen eingesetzt.



Messreihe	In Abbildung / Säulengruppe	Zuckerkomponente (A)	Amminosäurekomponente (B)	weitere Komponente (C)	molare Verhältnisse A:B:C:OPD
I	3.31 u.3.32	Xylose	Glycin	Kreatinin	1:2:2:1
II	3.33 / 1 u.4	Xylose	-	-	1:0:0:1
	3.33 / 2 u.5	Xylose	Glycin	-	1:2:0:1
	3.33 / 3 u.6	Xylose	Glycin	Kreatinin	1:2:2:1
III	3.34 / 1	Xylose	-	-	1:0:0:1
	3.34 / 2	Xylose	Glycin	-	1:2:0:1
	3.34 / 3	Xylose	Glycin	Kreatinin	1:2:2:1
	3.34 / 4	Arabinose	-	-	1:0:0:1
	3.34 / 5	Arabinose	Glycin	-	1:2:0:1
	3.34 / 6	Arabinose	Glycin	Kreatinin	1:2:2:1
	3.34 / 7	Ribose	-	-	1:0:0:1
	3.34 / 8	Ribose	Glycin	-	1:2:0:1
	3.34 / 9	Ribose	Glycin	Kreatinin	1:2:2:1
	3.34 / 10	Xylose	Alanin	-	1:2:0:1
	3.34 / 11	Xylose	Alanin	Kreatinin	1:2:2:1

### 6.5.3 Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) zur Bestimmung von HAA-Bildungsraten

#### Weitere Modellkomponenten

D-(+)-Xylose (Fluka, 95729)

D-(+)-Glucose (Merck, 1.08337.1000)

Methylglyoxal-Lösung, 40 % (w/v) in Wasser (Fluka 67028)

Norfuraneol (4-Hydroxy-5-methyl-2H-furan-3-on, Advanced Biotech, Paterson (NY))

Furfural (Fluka, 48070)

Hydroxyaceton (Fluka, 54142)

Hydroxymethylfurfural (Fluka, 55690)

Furaneol (Firma Extrasynthese)

Diacetyl (Fluka, 11038)

Xylulose-Alanin aus Kapitel 6.3.3.2

#### Zusammensetzung

Pro mmol an Kreatinin werden 1,25 g Avicel 0,0751 g Glycin bzw. 0,0890 g Alanin in den fleischextraktfreien Modellsystemen eingesetzt.

Bei der Herstellung von wasserarmen Modellsystemen auf Fleischextraktbasis wird anhand des Gesamtkreatiningehaltes des eingesetzten Fleischextraktes von 5,77 g/100g auf den Kreatiningehalt der Avicel-Fleischextrakt-Vormischung geschlossen und entsprechende Mengen weiterer Carbonyl-Modellkomponenten hinzugefügt. Diesen Modellsystemen werden keine Aminosäuren zugefügt.

#### 6.5.4 Herstellung von Avicel-Modellsystemen (AM) unter Einsatz $^{13}\text{C}$ -markierter Glucose – Labelingexperimente

##### Weitere Modellkomponenten

D-(+)-Glucose (Merck, 1.08337.1000)

6[ $^{13}\text{C}$ ]-Glucose (Aldrich, Steinheim)

Seesand (24 h gegläht bei 800 °C, Hochschullieferung)

##### Zusammensetzung

###### Vollmarkierung:

ein entsprechendes Modellsystem enthält als Trägermatrix statt Avicel Seesand:

Seesand	5,0000 g
Glycin	0,2995 g (4 mmol)
Kreatinin	0,4518 g (4 mmol)
D-6[ $^{13}\text{C}$ ]-Glucose	0,3718 g (2 mmol)

###### “50 %-Markierung”

ein entsprechendes Modellsystem enthält als Trägermatrix statt Avicel Seesand:

Seesand	5,0000 g
Glycin	0,30013 g (4 mmol)
Kreatinin	0,45608 g (4 mmol)
D-Glucose	0,19304 g (1 mmol)
D-6[ $^{13}\text{C}$ ]-Glucose	0,18699 g (1 mmol)

## 6.6 Definierte Lagerung von Avicel-Modellsystemen

### 6.6.1 Lagerung von Avicel-Modellsystemen (AM) in Exsikkatoren bestimmter Gleichgewichtsfeuchte

#### 6.6.1.1 Einstellung verschiedener Gleichgewichtsfeuchten in AM

##### Geräte und Hilfsmittel:

Vakuumsikkator 025 cm

Kristallisierschale 0 19 cm; 2,5 cm hoch

WOULF'sche Flasche mit Vakuummanometer

##### Reagenzien:

Lithiumchlorid (Merck, 1.0 5675.1000) (12 % R.L., 20 °C)

Kaliumacetat (Merck, 1.0 4820.1000) (23 % R.L., 20 °C)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Merck, 1.0 5833.1000) (33 % R.L., 20 °C)

Kaliumcarbonat (Merck, 1.0 4928.1000) (44 % R.L., 20 °C)

Magnesiumnitrat-Hexahydrat (Merck, 1.0 5854.1000) (52 % R.L., 20 °C)

Natriumchlorid (Merck, 1.0 6404.1000) (75 % R.L., 20 °C)

Kaliumchromat (Merck, 1.0 4951.1000) (88 % R.L., 20 °C)

**Arbeitsweise :**

Das Probenmaterial in dünner Schicht in einer Kristallisierschale über der jeweiligen gesättigten Salzlösung mit ausreichend Bodenkörper im Exsikkator lagern. Die perforierte Stellfläche des Exsikkators mit einem Papierfließ abdecken. Den Exsikkator auf 50 mbar Restdruck evakuieren. Die Einstellung des Gleichgewichtes durch Auswiegen des Probenmaterials feststellen (Modellsysteme ca. 2 Tage; Fleischextrakt ca. 4 Wochen). Die Gleichgewichtseinstellung kann durch Umrühren des Fleischextraktes in der Kristallisierschale beschleunigt werden.

**6.6.1.2 Kontrolle der Gleichgewichtsfeuchte von AM durch Bestimmung des Wassergehaltes nach der Vakuumtrockenschrankmethode**

**Geräte und Hilfsmittel:**

Vakuumtrockenschrank mit Silicagel (Heraeus, Hanau)

Trockenschrank (Heraeus, Hanau)

Wägegläschen Ø 50 mm, 30 ml

Nickelschale Ø 70 mm, weit mit flachem Boden

Pistill aus Glas

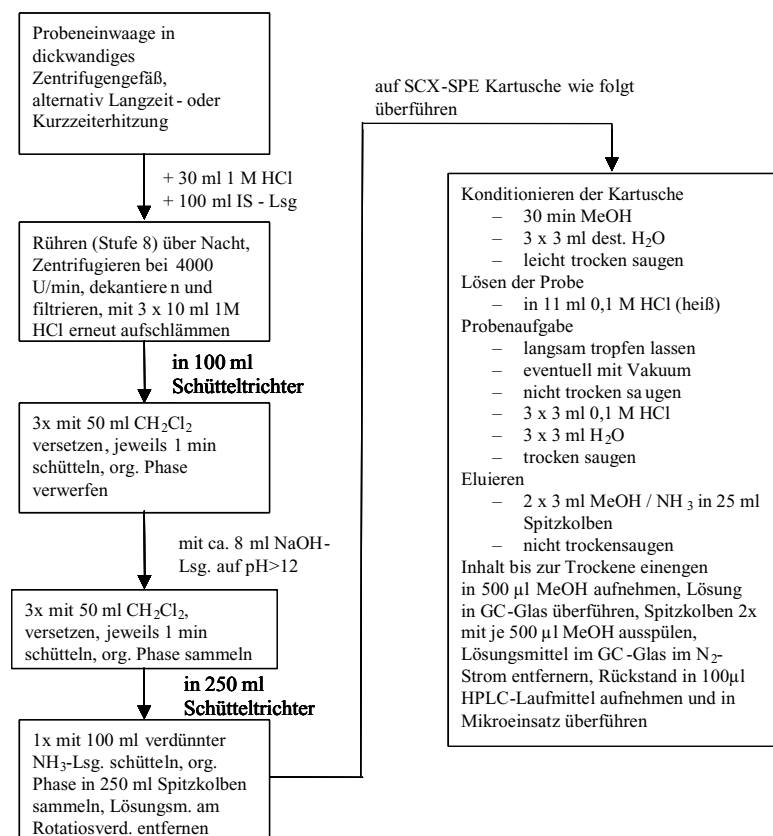
Seesand, gegläht bei 600 °C

**Arbeitsweise:**

2 g des Modellsystems in ein Wägegläschen einwiegen und 4 h bei 70 °C im Vakuumtrockenschrank unter Vakuum trocknen. Nach einer Abkühlzeit von 30 min im Exsikkator das Gewicht des Wägegläschens nach der Trocknung bestimmen. Unter gleichen Bedingungen zuvor das Leergewicht des Wägegläschens ermitteln.

## 6.7 Spezielle Arbeitsschritte zwecks Bestimmung der Bildungsrate von HAAs in erhitzten Avicel-Modellsystemen (AM)

Der Ablauf des Analysenganges ist schematisch in Abbildung 6.1 dargestellt



**Abbildung 6.2**

Schematischer Ablauf des Analysenganges bei der Extraktion, Isolation und Aufreinigung von AM

### 6.7.1 Erhitzung ( $T > 70\text{ °C}$ ) von Avicel-Modellsystemen in dickwandigen Glasgefäßen

#### Arbeitsweise:

Die Erhitzung von Avicel-Modellsystemen erfolgt in einem Trockenschrank mit Mikroprozessor-Temperaturregelung und Luftumwälzung (mindestens 50 pro h), damit die Gefäße schnell genug aufgeheizt werden und nach dem Öffnen des Trockenschrankes die Solltemperatur schnell genug wieder erreicht wird. Bevor der jeweilige Erhitzungsprozess beginnen kann, muss der Trockenschrank auf die entsprechende Solltemperatur 45 min vorgeheizt werden, um mögliche Temperaturschwankungen durch die noch nicht aufgeheizte Trockenschrankinnenverkleidung zu vermeiden. Im Innenraum des Trockenschrankes befindet sich ein kleines Sandbad dessen Temperatur vor Beginn der Erhitzungsprozesse zu überprüfen ist. Hat der Sand die eingestellte Solltemperatur erreicht, kann mit der Probenerhitzung begonnen werden.

Die entsprechenden Modellsysteme werden stets in 80 ml Zentrifugengläsern mit GL-Verschraubung und PTFE-beschichteter Silicon-Dichtungen erhitzt. Nach Abkühlung der

Gefäße müssen diese stets vorsichtig geöffnet werden, da sie unter Überdruck (ca. 4 bar) stehen.

### 6.7.2 Salzsäure Extraktion von HAAs aus erhitzten AM und Reaktionsaromen

#### Chemikalien und Reagenzien:

Lösung des inneren Standards 4,7,8-TriMeIQx in Methanol, dest. (10 ng/  $\mu$ l)

Salzsäure, 1 M

#### Arbeitsweise:

Die erhitzten Modellsysteme bzw. Reaktionsaromen werden mit 100  $\mu$ l Lösung des inneren Standards und 30 ml 1 M Salzsäure versetzt, der pH-Wert mit halbkonzentrierter Salzsäure wenn nötig auf  $\text{pH} < 2$  korrigiert, mit einem ausreichend dimensionierten Rührstäbchen (25 mm) versehen und am Vibrationsschüttler aufgeschlämmt. Die saure Extraktionslösung wird mindestens 7 h (am besten über Nacht) auf dem Magnetrührer (Stufe 8) gerührt.

### 6.7.3 Abtrennung von Salzsäure-unlöslichen Modellbestandteilen der AM und der Reaktionsaromen

#### Besondere Geräte und Hilfsmittel:

Schütteltrichter, 100 ml mit Schliff NS 19, deaktiviert

Reduzierstück NS 29 auf NS 19

Schlitzfiltersiebnuetsche mit angeschmolzenem Filtriervorstoß und Schliff NS 29 (Firma Willers, Münster)

Blaubandfilter,  $\varnothing$  100 mm (Schleier & Schüll, Dassel)

#### Chemikalien und Reagenzien:

Salzsäure, 1 M

#### Arbeitsweise:

Die Suspension von unlöslichen Bestandteilen in den salzsauren Extrakten der erhitzten AM und Reaktionsaromen wird durch Zentrifugation ( $4000 \text{ min}^{-1}$  bei 15 cm Rotordurchmesser, etwa 5 min) separiert. Der überstehende Extrakt wird dann in einen Schütteltrichter mit aufgesetzter Schlitzsiebnuetsche und Blaubandfilter dekantiert. Ggf. ist die Extraktionslösung durch das Filter zu saugen. Der feste Rückstand im Zentrifugenglas wird erneut mit 10 ml 1M Salzsäure unter Zuhilfenahme eines Vibrationsschüttlers aufgeschlämmt und erneut zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wird nochmals wiederholt.

### 6.7.4 Isolierung von HAAs durch Flüssig-Flüssig-Verteilschritte mit Dichlormethan

#### Besondere Geräte und Hilfsmittel:

Scheidetrichter 250 ml, deaktiviert

Spitzkolben 250 ml

**Chemikalien und Reagenzien:**

Dichlormethan, dest.

Salzsäure, 1 M

Salzsäure, 0,1 M

Destilliertes Wasser

Natriumhydroxidlösung, etwa 30 g NaOH in 100 ml dest. Wasser

verdünnte Ammoniaklösung, 25 %ige wässrige Ammoniaklösung/dest. Wasser 1+9 (v/v)

**Arbeitsweise:**

Den salzsauren Extrakt aus Kapitel 6.7.3 mit 3 x 50 ml Dichlormethan ausschütteln und die organischen Phasen verwerfen. An dieser Stelle kann ggf. leichte Emulsionsbildung auftreten. In diesem Fall die Emulsion in ein Zentrifugenglas ablassen und bei 4000 min<sup>-1</sup> zentrifugieren. Die wässrige Phase in den Schütteltrichter zurückgeben.

Die wässrige Phase mit Natriumhydroxidlösung auf pH 12 einstellen (pH-Wert mit dem pH-Meter überprüfen), mit 3 x 50 ml Dichlormethan ausschütteln und die organischen Phasen in einem Scheidetrichter sammeln. Sollte sich an dieser Stelle eine Emulsion bilden, diese im Schütteltrichter belassen und nach dem Ablassen der organischen Phase nach dem dritten Verteilschritt die Emulsion durch Zentrifugation brechen.

Die organischen Phasen sammeln und mit verdünnter Ammoniaklösung kräftigst ausschütteln. Die organische Phase in einen Spitzkolben ablassen. Die ammoniakalische Phase mit 30 ml Dichlormethan gegenschütteln und die organische Phase ablassen.

Die Dichlormethanphase anschließend am Rotationsverdampfer bei 40 °C bis zur Trockene einengen.

**6.7.5 Weitere Reinigung an SCX-Festphasen****Besondere Geräte und Hilfsmittel**

Filtriervorstoß mit Schliff NS 14,5 und durchbohrtem Schraubdeckel mit untergelegter Silicon-Dichtung

Einmalkanülen; Luer-Hub, 20 G x 2 3/4“, 0,90 x 70 mm

LiChrolut®, Extraktionssäulen für die Probenvorbereitung SCX (500 mg) (Merck, 1.02022.0001)

Rundkolben, 50 ml mit Schliff NS 14,5

Spitzkolben, 25 ml mit Schliff NS 14,5

**Chemikalien und Reagenzien**

Salzsäure, 0,1 M

dest. Wasser

Elutionslösung: Methanol/25 %ige wässrige Ammoniaklösung 9+1 (v+v)

Methanol, dest.

**Arbeitsweise:**

Die Extraktionssäule mit angesteckter Kanüle auf den Filtriervorstoß mit Rundkolben stecken und 30 min (entsprechen etwa 9 ml) mit Methanol konditionieren, anschließend 3 x mit 3 ml dest. Wasser spülen und leicht trockensaugen.

Die Probe aus Kapitel 6.7.5 im 250 ml Spitzkolben mit 11 ml siedener Salzsäure, 0,1 M, anlösen und die erkaltete Lösung auf die Extraktionssäule geben. Den Spitzkolben anschließend 3 x mit je 3 ml Salzsäure nachspülen und die Spüllösung auf die Extraktionssäule geben. Anschließend wird nochmals 3 x mit 3 ml dest. Wasser gewaschen und die Extraktionssäule trockengesaugt. Die Elution erfolgt mit 2 x 3 ml Elutionslösung in einen Spitzkolben.

Das Eluat wird bei 40 °C am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. Anschließend wird der Rückstand in 500 µl MeOH aufgenommen und die klare Lösung in ein GC-Glas überführt. Der Spitzkolben wird nochmals 2 x mit je 500 µl MeOH ausgespült. Nach jedem Spülschritt wird das Lösungsmittel im GC-Glas im N<sub>2</sub>-Strom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der so erhaltene Rückstand kann zur Bestimmung der HAAs weiter behandelt werden.

**6.8 Häufig verwendete instrumentell-analytische Analyseverfahren****6.8.1 HPLC****6.8.1.1 Mess- und Steuerparameter der verwendeten HPLC -Trennsysteme****HPLC1:**

Lösungsmittelentgaser: Modell Degasys DG 1410 (FirmaVDS Optilab, Montabaur)

Thermostatelement: Jetstream 2 (FirmaVDS Optilab, Montabaur)

HPLC-Pumpe: L-7100 (Merck, Darmstadt)

Autosampler: L-7200 (Merck, Darmstadt)

Detektoreinheiten:

## 1. UV/VIS

Detektor: UV-Vis, L-7420 (Merck, Darmstadt)

Response Time: 2s

Initial Sampling Period: 200 ms

Absorbance Mode 1 AU

Steuerinterface zum PC: D-7000 (Merck, Darmstadt)

Auswertesoftware: HPLC-System-Manager (HSM) 4.1 (Merck, Darmstadt)

Noise 300

Smoothing off

Sensitivity 20

Purity Threshold 0,950

## 2. DAD

Detektor: DAD, L-7450 (Merck, Darmstadt)

Spectral Bandwidth 7 nm

Spectral Interval 400 msec

Absorbance Mode 0,2 AU

Wavelength Range 200 nm – 400 nm  
 Steuerinterface zum PC: D-7000 (Merck, Darmstadt)  
 Auswertesoftware: HPLC-System-Manager (HSM) 4.1 (Merck, Darmstadt)  
 Noise 10  
 Smoothing off  
 Sensitivity 20  
 Purity Threshold 0,950

### 3. Fluorimetrimeter (dem DAD nachgeschaltet)

Detektor: Fluorescence Spectrophotometer RF 530 (Shimadzu, Duisburg)  
 Time Constant 1  
 Sensitivity 10  
 EX wavelengh  $\lambda = 333$  nm  
 EM wavelengh  $\lambda = 388$  nm  
 Steuerinterface zum PC: D-7000 (Merck, Darmstadt), externer analoger Eingang 1V/+1 V  
 Auswertesoftware: HPLC-System-Manager (HSM) 4.1 (Merck, Darmstadt)

### 4. amperometrischer Elektrochemischer Detektor (ELCD, dem DAD nachgeschaltet)

Detektor: Star 9080 (Varian, Darmstadt)  
 Wall-Jet-;Meßzelle Kohlenstoffelektrode, Ag/AgCl-Referenz, 25  $\mu$ m Spacer  
 Potential + 0,65 V (TEAP pH 7)  
 Range 50  $\mu$ A  
 Steuerinterface zum PC: D-7000 (Merck, Darmstadt), externer analoger Eingang 1V/+1 V  
 Auswertesoftware: HPLC-System-Manager (HSM) 4.1 (Merck, Darmstadt)

## HPLC2:

Lösungsmittelentgaser: HP Series 1100, Modell G1322A  
 (Hewlett-Packard, Agilent, Waldbronn)  
 Thermostatelement: HP Series 1100, Modell G1330 mit Säulenhaltung G1316A  
 HPLC-Pumpe: HP Series 1100, Modell G1311A  
 Autosampler: HP Series 1100, Modell G1329A  
 Detektor: HP Series 1100 DAD, Modell G1315A  
 Spectral Bandwidth 5 nm  
 Spectral Interval 100 msec  
 Absorbance Mode 0,25 AU  
 Wavelength Range 200 – 400 nm  
 Auswertesoftware: HP Chemstation for LC and LC/MS Systems  
 Noise 30  
 Smoothing off  
 Sensitivity 15



Threshold 0,300

### 6.8.1.2 Analytische HPLC-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur mit UV/Vis-Detektion

#### Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumformiat (Fluka, 17843)

Acetonitril

#### Trennbedingungen

Gerätekombination: HPLC 1 mit UV/Vis-Detektor

Säule: LiChrospher RP-18e (125 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule LiChrospher RP-18e (4 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 20 °C

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 50 min

Mobile Phase A: wässrige Ammoniumformiatlösung (30 mM, pH=3,5)

Mobile Phase B: Acetonitril

Gradient: von 10 % B auf 30 % B in 50 min, linearer Gradient

Fluss: 1 ml/min (konstant über die Laufzeit)

Injektionsvolumen: 20 µl

Detektion: Messwellenlänge  $\lambda = 310$  nm

### 6.8.1.3 Analytische HPLC-DAD-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur

#### Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumformiat (Fluka, 17843)

Acetonitril

#### Trennbedingungen

HPLC: HPLC2 mit DAD-Detektor

Säule: LiChrospher RP-18e (125 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) mit Vorsäule LiChrospher RP-18e (4 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 20 °C

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 50 min

Mobile Phase A: wässrige Ammoniumformiatlösung (30 mM, pH=3,5)

Mobile Phase B: Acetonitril

Gradient: von 10 % B auf 30 % B in 50 min, linearer Gradient

Fluss:	1 ml/min (konstant über die Laufzeit)
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektion:	DAD HP 1100 Series (Hewlett-Packard)
	Peakwidth: 0,2 min
	Responsetime: 2 s
	Spalt: 4 mm
Auswertesoftware:	HPLC-System-Manager (HSM) 4.1 (Merck-Hitachi)

#### 6.8.1.4 Semipräparative HPLC-DAD-Trennung von Verbindungen mit Chinoxalinstruktur mit anschließender Fraktionierung

##### Chemikalien und Reagenzien

Ammoniumformiat (Fluka, 17843)

Acetonitril

##### Trennbedingungen

Gerätekombination:	HPLC 1 mit DAD-Detektor, Rheodyne Schleifeninjektor 7125 (Techlab, Erkerode), und Fraktionssammler L-5260 (Merck, Darmstadt)
Säule:	LiChrospher 100 RP-18e (250 x 10 mm, Partikelgröße 10 µm) mit Vorsäule (LiChrospher 100 RP-18e (10x 10 mm, Partikelgröße 10 µm) (Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur:	20 °C
Eluent:	Gradientenelution, Laufzeit 50 min
	Mobile Phase A: wässrige Ammoniumformiatlösung (30 mM, pH=3,5)
	Mobile Phase B: Acetonitril
	Gradient: von 10 % B auf 30 % B in 50 min, linearer Gradient
Fluss:	5 ml/min (konstant über die Laufzeit)
Injektionsvolumen:	200 µl
Detektion:	Messwellenlänge $\lambda=310$ nm

#### 6.8.1.5 Analytische HPLC-DAD-Trennung von HAAs (Verwendung eines TEAP-Acetonitril-Eluent)

##### Chemikalien und Reagenzien

Referenzsubstanzen:

2-Amino-3-methylimidazo [4,5-f] chinolin (IQ)

2-Amino-3,4-dimethylimidazo [4,5-f] chinolin (MeIQ)

2-Amino-3,8-dimethylimidazo [4,5-f] chinoxalin (MeIQx)

2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo [4,5-f] chinoxalin (7,8-DiMeIQx)

2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo [4,5-f] chinoxalin (4,8-DiMeIQx)

2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo [4,5-f] chinoxalin (4,7,8- TriMeIQx)

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridin (PhIP)

Anschrift des Lieferanten der IQ-Verbindungen:

Toronto Research Chemicals inc.

4483 Chesswood DR., Downsview, Ontario, Canada M3J 2C3

Tel.: 416-638-9696

Fax: 416-638-9728

Triethylammoniumphosphat-Puffer (TEAP) 1 M, pH 3,0 (Fluka, 90362)

Acetonitril

Methanol

dest. Wasser

Phosphorsäure, 85 %ig (Aros, 20114-0025)

### **Arbeitsweise**

#### Herstellung von Referenzlösungen:

Zur Herstellung von Stammlösungen werden in 10 ml-Sovirelgläser SVL 15 etwa 1 mg der verschiedenen HAA-Referenzsubstanzen genau eingewogen und in 10 ml Methanol gelöst. Die Lagerung der Stammlösungen erfolgt im Tiefkühlschrank bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Bei Bedarf können aus den verschiedenen Stammlösungen Standardlösungen hergestellt werden. Dazu wird je 100  $\mu\text{l}$  (für die gelegentlich durchzuführende Kalibration 25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{l}$ ) der entsprechenden Stammlösung auf 100 ml mit Methanol verdünnt. Die Standardlösungen werden stets im Kühlschrank bei  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Herstellung der mobilen Phasen:

Zur Herstellung der TEAP-Pufferlösung, 10 mM, werden 10 ml TEAP mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure auf 2,8 eingestellt.

Zur Herstellung des Acetonitril-TEAP-Puffergemisches, 5mM, werden 500 ml der fertigen TEAP-Pufferlösung mit 500 ml Acetonitril versetzt und gründlich vermischt.

### **Trennbedingungen**

Gerätekombination: HPLC 1 mit DAD-Detektor

Säule: Edelsäule, 250 x 3 mm (MZ-Analytik, Mainz) gefüllt mit Supershere RP-select B-Material (Partikelgröße 4  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt) mit Vorsäule LiChrospher RP-18e (4 x 4 mm, Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ ) (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 20  $^{\circ}\text{C}$

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 75 min

Mobile Phase A: TEAP-Pufferlösung (10 mM, pH 2,8)

Mobile Phase B: Acetonitril-TEAP-Puffergemisches (5 mM)

Gradient: von 4 % B auf 50 % B in 30 min,  
von 50 % B auf 90 % B in 10 min,  
10 min isokratisch bei 90 % B  
von 90 % B auf 4 % B in 5 min  
20 min isokratisch bei 4 % B,

	jeweils lineare Gradienten
Fluss:	0,3 ml/min (konstant über die Laufzeit)
Injektionsvolumen:	5 µl
Detektion:	Messzeit 50 min, Messwellenlänge $\lambda = 265$ nm

### 6.8.1.6 Analytische HPLC-DAD-Trennung von HAAs (Verwendung eines Ammoniumformiat-Acetonitril-Eluenten)

#### Chemikalien und Reagenzien

Referenzsubstanzen (siehe 6.8.1.5)  
 Ammoniumformiat (Fluka, 17843)  
 Acetonitril  
 Methanol  
 dest. Wasser  
 Ameisensäure, 98 % - 100 % (Merck, 1.0264.2500)  
 Acetonitril

#### Arbeitsweise

Herstellung von Referenzlösungen (siehe Kapitel 6.8.1.5)

#### Herstellung der mobilen Phasen:

Zur Herstellung eines Ammoniumformiat-Puffers, 1 M, werden exakt 6,306 mg in einen 100 ml-Meßkolben eingewogen und mit 95 ml dest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird mit Ameisensäure auf pH 3,2 eingestellt und mit dest. Wasser bis zum 100 ml-Eichstrich aufgefüllt. Zur Herstellung der Ammoniumformiat-Pufferlösung, 10 mM, werden 10 ml des Ammoniumformiat-Puffers mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert wird nochmals überprüft und ggf. mit Ameisensäure auf 3,2 eingestellt.

Zur Herstellung des Acetonitril-Ammoniumformiat-Puffergemisches, 5 mM, werden 500 ml der fertigen Ammoniumformiat-Pufferlösung mit 500 ml Acetonitril versetzt und gründlich vermischt.

#### Trennbedingungen

Gerätekombination:	HPLC 1 mit DAD-Detektor
Säule:	Edelstahlsäule, 250 x 3 mm (MZ-Analytik, Mainz) gefüllt mit Supersphere RP-select B-Material (Partikelgröße 4 µm)(Merck, Darmstadt) mit Vorsäule LiChrospher RP-18e (4 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (Merck, Darmstadt)
Säulentemperatur:	20 °C
Eluent:	Gradientenelution, Laufzeit 80 min
	Mobile Phase A: Ammoniumformiat-Pufferlösung (10 mM, pH 3,2)
	Mobile Phase B: Acetonitril-Ammoniumformiat-Puffergemisch (5 mM)
	Gradient: von 10 % B auf 55 % B in 30 min,

	von 55 % B auf 100 % B in 10 min, 15 min isokratisch bei 100 % B von 100% B auf 10 % B in 5 min 20 min isokratisch bei 10% B, jeweils lineare Gradienten
Fluss:	0,3 ml/min (konstant über die Laufzeit)
Injektionsvolumen:	5 µl
Detektion:	Messzeit 55 min, Messwellenlänge $\lambda=265$ nm

## 6.8.2 HPLC-MS/MS

### 6.8.2.1 Mess- und Steuerparameter des verwendeten HPLC-MS/MS-Trennsystems (Firma Micromass)

#### HPLC-System:

Lösungsmittelentgaser:	HP Series 1100, Modell G1322A (Hewlett-Packard, Agilent, Waldbronn)
Thermostatelement:	HP Series 1100, Modell G1330 mit Säulenhaltung G1316A
HPLC-Pumpe:	HP Series 1100, Modell G1311A, Austausch der Hochdruckmischkammer von 500 µl auf 12 µl
Autosampler:	HP Series 1100, Modell G1329A

#### MS-MS-System:

Massenspektrometer:	Micromass Quattro LC, Manchester UK
Interface:	ESI-Interface: Nebuliser-Gas 84 l N <sub>2</sub> /h, Desolvation-Gas 855 l N <sub>2</sub> /h
	Tuning Parameter ES+: Kapillarspannung 3,5 kV Extraktor 5V RF-Lens 0,2 V Source Block Temperatur 110 °C Desolvation Temperatur 300 °C
MS1:	Entrance 80,0 V Exit 80,0 V Ion Energy 0,9 V Ion Energy Ramp 0,0 V LM Resolution 14,0 HM Resolution 14,0
MS2:	Ion Energy 3 V Ion Energy Ramp 0,0 V LM Resolution 12,5 HM Resolution 12,5
Detektor:	Dwell-Time 100 ms, Interchannel delay 0 s 650 V

### 6.8.2.2 Analytische HPLC-MS/MS-Trennung von HAAs (Verwendung eines Ammoniumformiat-Acetonitril-Eluenten)

#### Chemikalien und Reagenzien

Referenzsubstanzen (siehe 6.8.1.5)

Ammoniumformiat (Fluka, 17843)

Acetonitril

Methanol

dest. Wasser

Ameisensäure, 98 % - 100 % (Merck, 1.0264.2500)

Acetonitril

#### Arbeitsweise

Herstellung von Referenz-Stammlösungen (siehe Kapitel 6.8.1.5)

#### Herstellung von Referenz-Standardlösungen:

Bei Bedarf können aus den verschiedenen Stammlösungen Standardlösungen hergestellt werden. Dazu wird zunächst je 100 µl der entsprechenden Stammlösung mit Methanol auf 100 ml verdünnt und 1 ml dieser Lösung mit Methanol auf 10 ml verdünnt. Die Standardlösungen werden stets im Kühlschrank bei -4 °C gelagert.

#### Herstellung der mobilen Phasen:

Zur Herstellung eines Ammoniumformiat-Puffers, 1M, werden exakt 6,306 mg in einen 100 ml-Meßkolben eingewogen und mit 95 ml dest. Wasser aufgefüllt. Die Lösung wird mit Ameisensäure auf pH 3,5 eingestellt und mit dest. Wasser bis zum 100 ml-Eichstrich aufgefüllt. Zur Herstellung der Ammoniumformiat-Pufferlösung, 10 mM, werden 10 ml des Ammoniumformiat-Puffers mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert wird nochmals überprüft und ggf. mit Ameisensäure auf 3,5 eingestellt.

Zur Herstellung des Acetonitril-Ammoniumformiat-Puffergemisches, 5 mM, werden 500 ml der fertigen Ammoniumformiat-Pufferlösung mit 500 ml Acetonitril versetzt und gründlich vermischt.

#### Trennbedingungen

Säule: Edelsäule, 250 x 3 mm (MZ-Analytik, Mainz) gefüllt mit Supershe-re RP-select B-Material (Partikelgröße 4 µm)(Merck, Darmstadt) mit Vorsäule LiChrospher RP-18e (4 x 4 mm, Partikelgröße 5 µm) (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 20 °C

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 80 min

Mobile Phase A: Ammoniumformiat-Pufferlösung (10 mM, pH 3,5)

Mobile Phase B: Acetonitril-Ammoniumformiat-Puffergemisch (5 mM)

Gradient: von 20 % B auf 100 % B in 25 min,

35 min isokratisch bei 100 % B  
 von 100 % B auf 20 % B in 5 min  
 15 min isokratisch bei 20 % B,  
 jeweils lineare Gradienten

Fluss: 0,3 ml/min (konstant über die Laufzeit)

Injektionsvolumen: 5 µl

Detektion:

Analyt	Übergang	Collsion-Energy (eV)	Cone Voltage (V)
IQ	199,2 >157,1	37	45
	199,2 >184,1	27	45
IQx	200,3 >159,2	20	45
	200,3 >185,2	29	45
MeIQ	213,4 >145,1	27	45
	213,4 >198,2	27	45
MeIQx	214,4 >173,0	24	45
	214,4 >199,3	28	45
4,8-DiMeIQx u. 7,8-DiMeIQx	228,4 >160,2	30	40
	228,4 >213,3	26	40
4,7,8-TriMeIQx	242,2 >145,0	40	50
	242,2 >227,2	30	50
Norharman	169,0 >115,0	50	35
	169,0 >140,0	35	35
Harman	183,3 >115,0	34	50
	183,3 >168,2	28	50
PhIP	225,4 >140,2	56	48
	225,4 >210,0	29	48
MeAαC	198,4 >181,2	23	40
	198,4 >183,2	23	40

### 6.8.3 GC-FID / GC-ECD

#### 6.8.3.1 Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-FID- (und GC-ECD-)Trennsystems

GC: Autosystem XL (Perkin Elmer, Rodgau), mit Autosampler und druckprogrammierbarem Flüssig-Injektor (PSS)

Detektortypen: FID: Temperatur 300 °C  
 Brenngas: Wasserstoff 40 ml/min  
 Make Up: Luft 450 ml/min  
 ECD: Temperatur 300 °C  
 Make Up: N<sub>2</sub> (reinst) 45 ml/min

Auswertung: Turbochrom 6.1.0.2:G07 (Perkin-Elmer, Rodgau)

Bunching factor: 2 pts  
Noise threshold: 1  $\mu$ V  
Area threshold: 300  $\mu$ V  
Width ratio: 0,2  
Peak high ratio: 5  
Valley high ratio:3

### 6.8.3.2 Analytische GC-FID-Trennung von oximierten und silylierten OPD-haltigen Proben

#### Chemikalien und Reagenzien:

bidest. Wasser

Hydroxylamin-Hydrochlorid (Fluka, 55459)

D-(+)-Trehalose-Monohydrat (Fluka, 90208)

Xylit (Fluka, 95649)

Pyridin, über KOH gelagert

N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA, ABCR SIM 6576.0)

Trimethylchlorsilan (TMCS, Fluka 19780)

Trichlortrifluorethan (TCTFE, Riedel de Hën 34932)

#### Arbeitsweise:

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

Zur gaschromatographischen Untersuchung OPD-haltiger Proben werden jeweils etwa 250 mg in ein Sovirelglas eingewogen mit 2 ml bidest. Wasser unter Zuhilfenahme von Vibrationschüttler und Ultraschallbad (20 min, 40 °C) suspendiert, bei 3000  $\text{min}^{-1}$  zentrifugiert; ein Aliquot (1000  $\mu$ l) des Überstandes wird in ein GC-Gläschen überführt, bei -18 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird anschließend oximiert (+1000  $\mu$ l Oximierungsreagenz, 30 min, 70 °C) und silyliert (150  $\mu$ l oximiertes Lyophilisat + 115  $\mu$ l MSTFA + 11,5  $\mu$ l TMCS, 30 min, 70 °C; nach Erkalten + 125  $\mu$ l TCTFE).

#### Trennbedingungen (GC-FID)

Säule: HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Trägergas: Wasserstoff 1,2 ml/min (58 kPa)

Injektor: PSS-Split: 1:50

Temperatur: 250 °C

Ofen: 140 °C (0 min); mit 6 °C/min auf 210 °C (12 min); mit 15 °C/min auf 300 °C (8 min)

Injektionsvolumen: 1  $\mu$ l



**Berechnungsschema:**

Innerer Standard: Xylit (im Oximierungsreagenz gelöst), alternativ über Trehalose

1. Konzentration der Probenkomponenten ( $C_P$ ) in der oximierten und silylierten Analysenprobe:

Mit  $C_{IS}$  Konzentration des inneren Standard in der aufgearbeiteten Ana-

$$C_P = \frac{F_P}{F_{IS}} \cdot C_{IS} \cdot f$$

lysenprobe in [mg/ml Analysenprobe]

$F_P$  bzw.  $F_{IS}$  Fläche des inneren Standards bzw. der Probenkomponente

In Ermangelung von Referenzsubstanzen ist der Responsefaktor hilfsweise gleich 1 zu setzen

2. Umrechnung auf absolute Menge im Extrakt in [mg]
3. Umrechnung auf Gehalt im Modell in [mg/g Modell]
4. Durch Bezugnahme auf den Xylosegehalt im Modell erhält man die Menge Probenkomponente pro g Xylose im Modell
5. Mit der Festlegung, dass grundsätzlich das Chinoxalinderivat vom jeweiligen 2- Pentoson Bezugsgröße (molare Masse  $M=148$  g/mol) ist und mit  $M_{(Xylose)}=150$  g/mol kann man den Gehalt an der entsprechenden Reaktionskomponente A, B bzw. C in [mmol/mol Pentose] ausdrücken

**6.8.4 GC-ITD****6.8.4.1 Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-ITD-Trennsystems**

GC:	Dani 85.21a mit GC-Control 853.1 (Axel Semrau, Sprockhövel)	
Säule:	DB 5.625; 30 m; Filmdicke 0,25 $\mu$ m; i.D. 0,32 mm (Fisons Instruments, Mainz-Kastel)	
Trärgas:	Helium 1,2 ml/min bei 80 C	
Injektor:	Dani-Kaltaufgabesystem L-PTV (Axel Semrau, Sprockhövel)	
PTV:	40 °C (0,4 min); mit 900 °C/min auf 325 °C (8 min)	
Split:	auf 0 - 0,3 min bei 30 ml/min; geschlossen 0,3 min - 1 min; auf 1 min - Ende	
Injektionsvolumen:	Fleischextrakt 1 $\mu$ l; Modellsystem 3 $\mu$ l	
Detektor:	Ion-Trap 800 (Firma Kniel, Duisburg)	
	Transferline:	250 °C
	Elektronenstoßionisation (EI,70 eV)	
	Acquisition mode:	Full scan
	Scan range:	196-285
	Scan-timw:	1 s
	Threshold:	1 count
	AGC on background mass:	195
	Micro scans:	10
	Multipliiert:	2500 V

Transferline: 250 °C  
Auswertung: ITDS Revision 4.10; ARC CI Software; NBS Library (Axel Semrau, Sprockhövel), Windows 3.11-Emulation unter Windows 2000

## 6.8.5 GC-Quadrupol-MS (kurz: GC-MS)

### 6.8.5.1 Mess- und Steuerparameter des verwendeten GC-MS-Systems

#### 1. Grundlegende Geräteparameter

GC: HP 6890 Series GC System (Firma HP/Agilent, Waldbronn)  
Probengeber: CTC Combi Pal (Firma CTC, CH-Zwingen),  
Flüssiginjektion mit 10 µl Spritze  
Injektor: druck- und flussgesteuert, Septum-Purge 2 ml  
bevorzugter Verdampfungsliner: 18740–80220 (Supelco)  
Trärgas: Helium 4.8 (Westfalengas, Münster) mit nachgeschalteter Gasreinigungs  
Kartusche, Vordruck 5,5 bar  
Vorvakuumpumpe: Edwards RV3 (Firma Edwards, Kirchheim)  
Vakuumpumpe: Turbomolekularpumpe (Firma Edwards)  
Interface: kombiniertes EI/CI-Interface,  
Übergang von der Säule: Restek Conversation Fitting  
MSD: HP 5873 MSD (Firma HP/Agilent, Waldbronn) mit EI und CI-Quelle  
Auswertung: ChemStation für GC-MS, Version B.1.7 (Firma HP/Agilent, Waldbronn)

#### 2. Spezielle Parameter Elektronenstoßionisation (EI)

Quellentemperatur: 230 °C  
Massenfiltertemp.: 150 °C  
Ionisationsenergie: 70 eV

Tuning des Massenfilters und des Detektors über die Software:

PFTBA verdampft und gelang über ein Ventil direkt in die Ionenquelle; der Tune erfolgt über die Fragmentionen  $m/z = 69, 219, 502$ .

Beispiel-Tune:

Ion Pol pos., Emission 34,6, EleEnergy 69,9, Repeller 23,42, IonFocus 89,2, EntLens 18,5, EntOffs 17,82, MassGain -418, MassOffs -11, AmuGain 1540, AmuOffs 133, Wid219 -0,005, DC Pol pos., HED on, EMVolts 1576

#### 3. Spezielle Parameter Chemische Ionisation (CI)

Quellentemperatur: 250 °C bei PCI, 150 °C bei NCI  
Massenfiltertemp.: 106 °C  
Ionisationsenergie: etwa 200 eV, variiert je nach Reaktandgas, wird über Tune optimiert

Reaktandgase:

Methan 4.0 (Westfalengas, Münster): 1,5 bar Vordruck, Verbrauch ca. 0,75 ml/min

Ammoniak 3.8 W, unter Druck verflüssigt (Westfalen Gas, Münster): 0,3 bar Vordruck, Verbrauch ca. 1 ml/min

Spezielle Gasarmaturen:

Methan: zweistufiger Flaschendruckminderer (Messer Griesheim), Gasreinigungskartusche (Hewlett-Packard, G1999-80410)  
Ammoniak: sämtliche Amaturen aus Edelstahl, Einstufiger Flaschendruckminderer aus Edelstahl Typ 1SSL; 0-1,5 bar (Firma Gastech, Mühlheim)

Tuning des Massenfilters und des Detektors über die Software:

Methan PCI: Tune mit PFDTD, Direkteinlass in CI – Gas, über  $m/z = 41, 267, 599$   
Ammoniak PCI: Übernahme der Tune-Parameter aus entsprechendem Methan-Tune  
Ammoniak NCI: Tune mit PFDTD, Direkteinlass in CI – Gas, über  $m/z = 185, 351, 517$

Beispiel-Tune: Ion Pol pos., Emission 237,3, EleEnergy 235,0, Filament 1, Repeller 2,15, IonFocus 125,3, EntLens 7,0, EntOffs 21,84, MassGain -413, MassOffs -10, AmuGain 1530, AmuOffs 128, Wid219 -0,057, DC Pol pos., HED on, EMVolts 1894

### 6.8.5.2 Analytische GC-MS-Trennung von oximierten und silylierten zuckerhaltigen Proben

#### Chemikalien und Reagenzien:

D-(+)-Trehalose-Monohydrat (Fluka, 90208)  
Xylit (Fluka, 95649)  
Hydroxylamin-Hydrochlorid (Riedel de Häen, 33236)  
O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid (Fluka, 67546)  
Pyridin, über KOH gelagert  
N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA, ABCR SIM 6576.0)  
Trimethylchlorsilan (TMCS, Fluka 19780)  
Trichlortrifluorethan (TCTFE)(Riedel de Häen, 34932)

#### Arbeitsweise:

##### Oximierungsreagenz:

Zur Herstellung des Oximierungsreagenzes werden 50,0 mg Xylit, 50,0 mg Trehalose als interne Standards und 2,50 g Hydroxylammoniumchlorid mit Pyridin auf 100 ml aufgefüllt. Zur weiteren Strukturabsicherung können die Proben mit einem Oximierungsreagenz versetzt werden, das O-Methylhydroxylamin-Hydrochlorid enthält.

Vorbereitung:

alternativ je nach Experiment werden eingesetzt:

- a) 1000 µl des jeweiligen eingeeengten Rohextraktes aus 6.3.2 werden im Vakuumverdampfer nach Schulte<sup>1</sup> für ca. 1h belassen (40 °C, 20 mbar), so dass man einen trockenen Rückstand erhält.
- b) Entsprechende Fraktionen der Flüssigchromatographischen Trennungen aus 6.3.3.3 und 6.3.3.4 werden vereinigt, eventuell vorhandenes organisches Lösungsmittel bei Raumtemperatur am Rotationsverdampfer entfernt, der wässrige Rückstand bei -18 °C tiefgefroren und gefriergetrocknet. 3 mg des Lyophilisats werden eingesetzt.
- c) 3 mg des Lyophilisats der Kationenaustauscheraufreinigung aus 6.3.3.2 werden direkt eingesetzt.
- d) jeweils 5 mg von sonstigen Proben werden eingesetzt

Derivatisierung:

Die entsprechenden Rückstände bzw. Lyophilisate werden oximiert (+ 1000 µl Oximierungsreagenz, 30 min, 70 °C) und silyliert (150 µl oximierte Probe + 115 µl MSTFA + 11,5 µl TMCS, 30 min, 70 °C; nach Erkalten + 125 µl TCTFE).

**Trennbedingungen (GC-MS/EI)**

Säule:	DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W)
Trärgas:	1,9 ml/min konstant, Start: 2,8 bar bei 140 °C
Injektor:	Split 1:50                      Temperatur 250 °C
Ofen:	140 °C (0 min); mit 6 °C/min auf 210 °C (12 min); mit 15 °C/min auf 300 °C (8 min)
Injektionsvolumen:	1 µl
Transferline:	340 °C
Detektor:	SCAN-Modus; low mass: 70; high mass 800 Solvent-delay: 3 min

**6.8.5.3 Analytische GC-MS-Trennung von oximierten und silylierten OPD-haltigen Proben****Chemikalien und Reagenzien:**

siehe Kapitel 6.8.3.2

**Vorbereitung der Proben, Derivatisierung**

siehe Kapitel 6.8.3.2

---

<sup>1</sup> Unpatentierte Entwicklung nach Dr. E. Schulte, Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster

**Trennbedingungen (GC-MS/EI)**

Säule:	DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W, Vertrieb durch Firma Agilent, Waldbronn)	
Trägergas:	1,9 ml/min konstant, Start: 2,8 bar bei 140 °C	
Injektor:	Split 1:50	Temperatur: 250 °C
Ofen:	140 °C (0 min); mit 6 °C/min auf 210 °C (12 min); mit 15 °C/min auf 300 °C (8 min)	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	340 °C	
Detektor:	SCAN-Modus; low mass: 50; high mass 800 Solvent-delay: 3 min	

**Berechnungsschema:**

Innerer Standard: Xylit (im Oximierungsreagenz gelöst), alternativ über Trehalose

6. Konzentration der Probenkomponenten ( $C_P$ ) in der oximierten und silylierten Analysenprobe:

Mit  $C_{IS}$  Konzentration des inneren Standard in der aufgearbeiteten Ana-

$$C_P = \frac{F_P}{F_{IS}} \cdot C_{IS} \cdot f$$

lysenprobe in [mg/ml Analysenprobe]

$F_P$  bzw.  $F_{IS}$  Fläche des inneren Standards bzw. der Probenkomponente

In Ermangelung von Referenzsubstanzen ist der Responsefaktor hilfsweise gleich 1 zu setzen

- Umrechnung auf absolute Menge im Extrakt in [mg]
- Umrechnung auf Gehalt im Modell in [mg/g Modell]
- Durch Bezugnahme auf den Xylosegehalt im Modell erhält man die Menge Probenkomponente pro g Xylose im Modell
- Mit der Festlegung, dass grundsätzlich das Chinoxalinderivat vom jeweiligen 2- Pentoson Bezugsgröße (molare Masse  $M=148$  g/mol) ist und mit  $M_{(Xylose)}=150$  g/mol kann man den Gehalt an der entsprechenden Reaktionskomponente A, B bzw. C in [mmol/mol Pentose] ausdrücken

**6.8.5.4 Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (EI)****Chemikalien und Regagenzien:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Arbeitsweise:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Trennbedingungen (GC-MS/EI)****I. 100 % Dimethylpolysiloxan-Belegung**

Säule	DB-1 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W, Vertrieb durch Firma Agilent, Waldbronn)	
Trägergas:	1,9 ml/min konstant,	
Injektor:	pulsed split/splitless:	4 bar für 1,5 min, Split nach 0,2 min geöffnet
	Temperatur:	300 °C
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 235 °C (3 min); mit 1 °C/min; auf 270 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (0 min); mit 25 °C/min auf 320 °C (4 min); mit 25 °C/min auf 340 °C (0 min)	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	300 °C	
Detektor:	SCAN-Modus:	low mass: 50; high mass 400; solvent delay: 5 min
	SIM-Modus:	Massen: 255, 256, 269, 270, 284, 298, 281 high resolution, dwell: 100, solvent delay 10 min

**II. 5% Diphenyl - 95% Dimethylpolysiloxan-Belegung**

Säule	RTX-5 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (Restek, Bad Soden)	
Trägergas:	1,9 ml/min konstant,	
Injektor:	pulsed split/splitless:	4 bar für 1,5 min, Split nach 0,2 min geöffnet
	Temperatur:	300 °C
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 220 °C (3 min); mit 1 °C/min auf 270 °C (0 min); mit 5 °C/min auf 300 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (0 min) ; mit 25 °C/min auf 340 °C	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	300 °C	
Detektor:	vgl. Abschnitt I.	

**III. 5 % Diphenyl – 95 % Dimethylpolysiloxan-Belegung, crosslinked**

Säule	DB-5.625 (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) (Fisons Instruments, Mainz-Kastel)	
Trägergas:	3 ml/min konstant,	
Injektor:	pulsed split/splitless:	1,3 bar für 1,5 min, Split nach 1 min geöffnet
	Temperatur:	300 °C
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 220 °C (3 min); mit 1,5 °C/min auf 240 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 275 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (3 min) ; mit 25 °C/min auf 325 °C	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	300 °C	
Detektor:	vgl. Abschnitt I.	

### 6.8.5.5 Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (PCI-Methan)

**Chemikalien und Regagenzien:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Arbeitsweise:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Trennbedingungen (GC-MS/PCI mit Methan)**

Säule	DB-1 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W, Vertrieb durch Firma Agilent, Waldbronn)	
Trägergas:	1,0 ml/min konstant,	
Injektor:	pulsed split/splitless:	2,5 bar für 1,5 min, Split nach 0,5 min geöffnet
	Temperatur:	300 °C
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 235 °C (3 min); mit 1 °C/min auf 290 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (0 min); mit 25 °C/min auf 320 °C (4 min); mit 25 °C/min auf 340 °C (0 min)	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	320 °C	
Detektor:	SIM-Modus: Massen:	313, 314, 327, 328, 342, 356, 339 high resolution, dwell: 100, solvent delay 20 min

### 6.8.5.6 Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (PCI-Ammoniak)

**Chemikalien und Regagenzien:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Arbeitsweise:**

siehe Kapitel 6.9.6

**Trennbedingungen (GC-MS/PCI mit Ammoniak)**

Säule	DB-1 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W, Vertrieb durch Firma Agilent, Waldbronn)	
Trägergas:	1,0 ml/min konstant,	
Injektor:	pulsed split/splitless:	2,5 bar für 1,5 min, Split nach 0,5 min geöffnet
	Temperatur:	300 °C
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 235 °C (3 min); mit 1 °C/min auf 290 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (0 min); mit 25 °C/min auf 320 °C (4 min); mit 25 °C/min auf 340 °C (0 min)	
Injektionsvolumen:	1 µl	
Transferline:	320 °C	
Detektor:	SIM-Modus: Massen:	313, 314, 327, 328, 342, 356, 339 high resolution, dwell: 100, solvent delay 20 min

### 6.8.5.7 Analytische GC-MS-Trennung von TBDMS-Ethern (NCI-Ammoniak)

#### Chemikalien und Reagenzien:

siehe Kapitel 6.9.6

#### Arbeitsweise:

siehe Kapitel 6.9.6

#### Trennbedingungen (GC-MS/NCI mit Ammoniak)

Säule	DB-1 (60 m x 0,25 mm x 0,10 µm) (J&W, Vertrieb durch Firma Agilent, Waldbronn)		
Trärgas:	1,0 ml/min konstant,		
Injektor:	pulsed split/splitless:	2,5 bar für 1,5 min, Split n. 0,5 min geöffnet	
	Temperatur:	300 °C	
Ofen:	180 °C (3 min); mit 5 °C/min auf 235 °C (3 min); mit 1 °C/min auf 290 °C (0 min); mit 10 °C/min auf 300 °C (0 min); mit 25 °C/min auf 320 °C (4 min); mit 25 °C/min auf 340 °C (0 min)		
Injektionsvolumen:	1 µl		
Transferline:	280 °C		
Detektor:	SIM-Modus: Massen:	311, 312, 325, 326, 339, 354, 337	
		high resolution, dwell: 100,	
		solvent delay 20 min	

## 6.9 Derivatisierungstechniken

### 6.9.1 Acetylierung von HAAs durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid (Ac<sub>2</sub>O)

#### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum

Mikroeingänge für GC-Glas, 2 ml

#### Chemikalien und Reagenzien

Essigsäureanhydrid (Merck, 1.00042.1000)

Pyridin, über KOH gelagert

HAA-Referenzsubstanzen (siehe 6.8.1.5)

#### Arbeitsweise:

Entsprechende Probe- und Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert und das Lösungsmittel im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der Rückstand wird mit 25 µl Essigsäureanhydrid und 75 µl Pyridin versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht im dicht verschlossenen GC-Glas stehen gelassen. Die so acetylierte Lösung kann direkt zur Gaschromatographie eingesetzt werden.



### 6.9.2 Acylierung von HAAs durch Umsetzung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid (PFPA)

#### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum  
Mikroeinsätze für GC-Glas, 2 ml

#### Chemikalien und Reagenzien

Dichlormethan (Merck, 1.06050.2504)

bidest. Wasser

wässrige Lösung von Natriumcarbonat (Acros, 27107-0025), 0,5 M

Acetonitril, dest.

10 %ige Lösung (v/v) von Pentafluorpropionsäureanhydrid (Fluka, 77292) in Acetonitril  
HAA-Referenzsubstanzen (siehe 6.8.1.5)

#### Arbeitsweise:

Entsprechende Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert und das Lösungsmittel im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der weitere Verlauf ist in Abbildung 6.2 dargestellt.

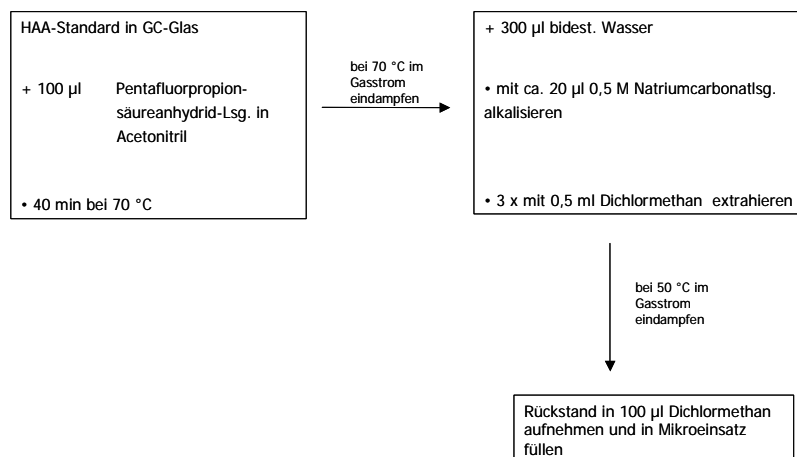


Abbildung 6.3

Arbeitsschritte bei der Acylierung von HAAs durch Umsetzung mit Pentafluorpropionsäureanhydrid

### 6.9.3 Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit 3,5-Bis(trifluoromethyl)-benzylbromid (TFBB)

#### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum  
Mikroeinsätze für GC-Glas, 2 ml

#### Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, dest.

5 %ige Lösung (v/v) von 3,5-Bis-(trifluormethyl)-benzylbromid (Aldrich, 26,339-7) in Acetonitril

N,N-Diisopropyl-ethylamin (Sigma, D3887)

bidest. Wasser

wässrige Lösung von Natriumcarbonat (Acros, 27107-0025), 0,5 M

Hexan, dest.

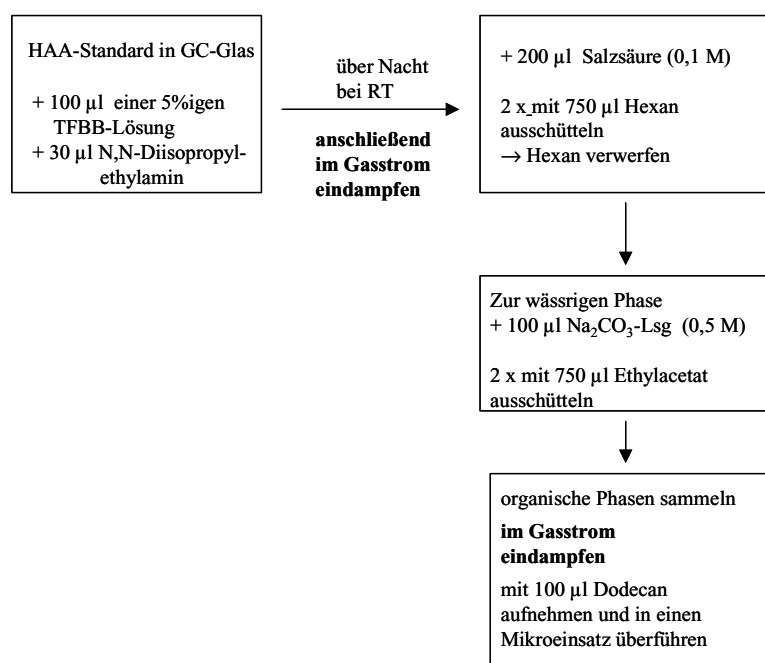
Ethylacetat (Merck, 1.09623.2504)

Dodecan (Riedel de Häen, 46155)

HAA-Referenzsubstanzen (siehe Kapitel 6.8.1.5)

### Arbeitsweise:

Entsprechende Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert und das Lösungsmittel im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der weitere Verlauf ist in Abbildung 6.3 dargestellt.



**Abbildung 6.4**

Arbeitsschritte bei der Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit 3,5-Bis(trifluoromethyl)-benzylbromid

## 6.9.4 Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit $\alpha$ -Pentafluorotoluol

### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum

Mikroeinsätze für GC-Glas, 2 ml

### Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril, dest.

5 % ige Lösung (v/v) von  $\alpha$ -Pentafluorotoluol (Fluka 76756) in Acetonitril

Triethylamin (Fluka, 90335)

bidest. Wasser

wässrige Lösung von Natriumcarbonat (Acros, 27107-0025), 0,5 M

Hexan, dest.

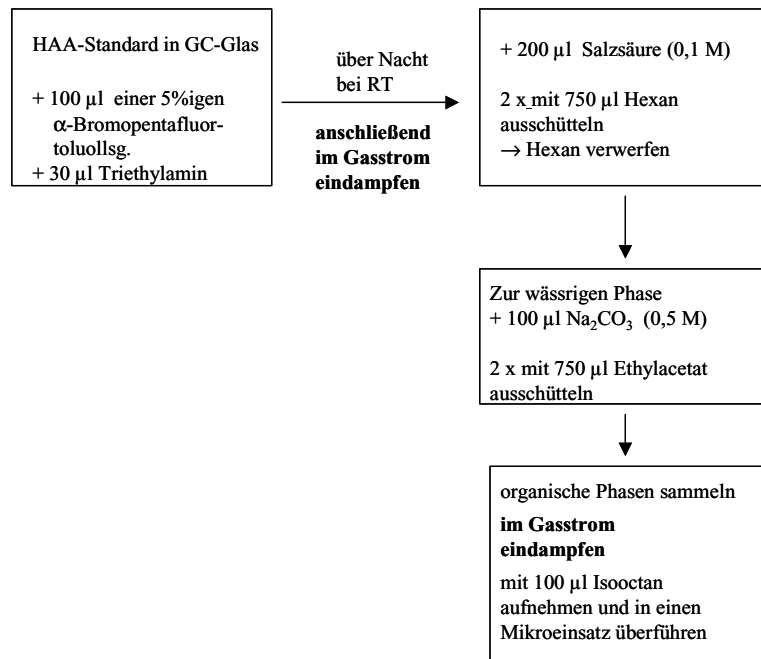
Ethylacetat (Merck, 1.09623.2504)

Isooctan (Fluka, 59050)

HAA-Referenzsubstanzen (siehe Kapitel 6.8.1.5)

### Arbeitsweise:

Entsprechende Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert und das Lösungsmittel im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der weitere Verlauf ist in Abbildung 6.4 dargestellt.



**Abbildung 6.5**

Arbeitsschritte bei der Alkylierung von HAAs durch Umsetzung mit  $\alpha$ -Pentafluorotoluol

## 6.9.5 Silylierung von HAAs durch Umsetzung mit N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA)

### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum

Mikroeinsätze für GC-Glas, 2 ml

### Chemikalien und Reagenzien

N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA, ABCR SIM 6576.0)

Trimethylchlorsilan (TMCS, Fluka, 19780)

Pyridin, über KOH gelagert

### Arbeitsweise:

Entsprechende Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert und das Lösungsmittel im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Anschließend werden 115  $\mu$ l MSTFA und 11,5  $\mu$ l TMCS zugefügt, das Gläschen rasch verschlossen und 30 min bei 70 °C erhitzt. Die so silylierte Lösung kann direkt zur Gaschromatographie eingesetzt werden.

### 6.9.6 Silylierung von HAAs durch Umsetzung mit N-tert.-Butyldimethylsilyl-N-methyl-trifluoracetamid (MTBSTFA)

#### Geräte und Hilfsmittel

GC-Glas, 2 ml mit Schraubdeckel und PTFE-beschichtetem Silikon-Septum  
Mikroeinsätze für GC-Glas, 2 ml

#### Chemikalien und Reagenzien

Derivatisierungslösung: 1 %ige Lösung (w/v) von tert.-Butyldimethylchlorsilan (TBDMCS, Fluka 19905) in N-(tert-Butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluor-acetamid (MTBSTFA, ABCR SIB 1966)

Acetonitril, destilliert und über Molekularsieb gelagert

#### Arbeitsweise:

Entsprechende Probe- und Standardlösungen werden in ein GC-Glas einpipettiert; das Lösungsmittel wird im Gasstrom entfernt (vgl. Kapitel 6.2.3). Der Rückstand wird in 100 µl Acetonitril aufgenommen. Nach Zugabe von 100 µl Derivatisierungslösung wird das GC-Glas rasch verschlossen und 30 min bei 70°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch kann ohne weitere Abtrennung des Reagenzes zur Gaschromatographie eingesetzt werden.

### 6.9.7 Quantitative Bestimmung über 4,7,8-TriMeIQx als innerem Standard

Die Auswertung der Proben erfolgt über den inneren Standard 4,7,8-TriMeIQx, der bereits bei der salzsauren Extraktion der Modellsysteme und Proben (vgl. Kapitel 6.7.2) zugesetzt wird. In einem Kalibrationslauf mit bekannten Konzentrationen an HAAs werden die Response-Faktoren für die einzelnen Substanzen ermittelt (Gleichung 6.1).

$$R_{SUB} = \frac{A_{ISTD} \cdot C_{SUB}}{c_{ISTD} \cdot A_{SUB}}$$

#### Gleichung 6.1

R<sub>SUB</sub>: Response-Faktor

A<sub>ISTD</sub>: Fläche des inneren Standards im Kalibrationslauf

c<sub>ISTD</sub>: Konzentration des inneren Standards im Kalibrationslauf

A<sub>SUB</sub>: Fläche der zu untersuchenden Substanz im Kalibrationslauf

c<sub>SUB</sub>: Konzentration der zu untersuchenden Substanz im Kalibrationslauf

Über die Response-Faktoren der einzelnen Substanzen kann man schon erste Aussagen über die Qualität der Silylierung machen. So sollte der Response-Faktor konstant und nur wenig von 1,0 unterschiedlich sein.

Die Konzentration der jeweiligen Substanz in dem Analysenlauf berechnet sich dann mit Hilfe des ermittelten Response-Faktors (Gleichung 6.2).

$$c_{SUB} = \frac{R_{SUB} \cdot A_{SUB} \cdot c_{ISTD}}{A_{ISTD}}$$

**Gleichung 6.2**

$c_{SUB}$ : Konzentration der zu untersuchenden Substanz im Analysenlauf

$A_{SUB}$ : Fläche der zu untersuchenden Substanz im Analysenlauf

$R_{SUB}$ : Response-Faktor der zu untersuchenden Substanz aus Gleichung 6

$A_{ISTD}$ : Fläche des inneren Standards im Analysenlauf

$c_{ISTD}$ : Konzentration des inneren Standards im Analysenlauf

**6.10 Sonstige wichtige analytische Mess- und Bestimmungsmethoden****6.10.1 Durchführung von Bräunungsmessungen****Geräte und Hilfsmittel**

Sovirelglas, SVL-15

**Chemikalien**

bidest. Wasser

**Arbeitsweise:**Zusammensetzung:

Versuchsreihe 1: molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: Kreatinin = 0,5:1:1  
 molares Verhältnis von D-Xylose:L-Alanin: Kreatinin = 0,5:1:1  
 molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: = 0,5:1  
 7,5 g Avicel je g Xylose

Versuchsreihe 2: molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: Kreatinin = 0,5:1:1  
 molares Verhältnis von D-Xylose:L-Alanin: Kreatinin = 0,5:1:1  
 molares Verhältnis von D-Xylose:L-Glycin: = 0,5:1  
 10 g Avicel je g Xylose

Aufarbeitung:

## Messreihe 1:

Je 100 mg der entsprechenden Analysenprobe werden in ein Sovirelglas eingewogen und mit 2 ml bidest. Wasser versetzt. Zur besseren Extraktion wird die Probe kräftig geschüttelt und 30 min im Ultraschallbad belassen und bei 3000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Der Überstand wird photometrisch direkt zur Messung eingesetzt.

## Messreihe 2:

Je 150 mg der entsprechenden Analysenprobe werden in ein Sovirelglas eingewogen und bei glycinhaltigen Modelle mit 16 ml bidest. Wasser bzw. bei alaninhaltigen Modellen mit 4 ml bidest. Wasser versetzt und analog zu Messreihe 1 weiter aufgearbeitet.

Photometrische Parameter:

Gerät: UV/Vis-Spektrometer Lambda 40 (Perkin Elmer, Rodgau),

	1 cm Quarzglasküvetten
Messgröße:	Extinktion/Absorption
Wellenlänge:	Scanbereich von 200 bis 700 nm
Spalt:	2 nm
Lampe:	Wolfram (Vis) und Deuterium (UV)

### 6.10.2 Analyse von Aminosäuren mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion nach Vorsäulenderivatisierung mit OPA

#### Chemikalien und Reagenzien

Natriumacetat, wasserfrei (Acros, 14961-0010)

Triethanolamin (Fluka, 90278)

Acetonitril für die Flüssigkeitschromatographie

Methanol für die Flüssigkeitschromatographie

Natriumtetraborat (Fluka, 71998)

Tetrahydrofuran (Merck, 1.09731.2500)

Natronlauge, 1 M

o-Phthalaldehyd (Fluka, 79730)

2-Mercaptoethanol (Fluka, 63689)

Vergleichsubstanzen: verschiedene Aminosäuren (Merck)

#### Arbeitsweise

##### Herstellung der Fließmittel

Mobile Phase A:

2,72 g Natriumacetat-Trihydrat werden unter Rühren in 1 l Wasser gelöst. Man gibt 180 µl Triethanolamin hinzu und stellt den pH-Wert der Lösung mit Essigsäure auf einen Wert von 7,20 ( $\pm 0,05$ ) ein. Anschließend werden noch 3,0 ml Tetrahydrofuran zugegeben und der fertige Puffer gründlich gemischt.

Mobile Phase B:

2,72 g Natriumacetat-Trihydrat werden unter Rühren in 200 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird mit Essigsäure auf einen Wert von 7,20 ( $\pm 0,05$ ) gebracht. Parallel dazu stellt man eine Mischung aus 400 ml Acetonitril und 400 ml Methanol her. Schließlich werden die beiden Lösungen vereint und gründlich gemischt.

##### Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthalaldehyd (OPA)

Boratpuffer (0,1 mol/l): 1,9 g Natriumtetraborat werden in 50 ml Wasser gelöst und mit Natronlauge (1 mol/l) auf pH 10,4 eingestellt.

OPA-Reagenz: 65 mg o-Phthalaldehyd und 20 µl 2-Mercaptoethanol werden in 20 ml Boratpuffer (0,1 mol/l) gelöst.

##### Durchführung:

Die Vorsäulenderivatisierung findet mit Hilfe eines Injektionsprogrammes in der Injektionspritze des Autosamplers statt. Hierfür werden die einzelnen Lösungen in verschiedene Vials

im Autosampler gegeben. Mit der 8 µl-Spritze werden jetzt nacheinander 5 µl Boratpuffer, 1 µl OPA-Reagenz und 1 µl Probenlösung aufgezogen. Im Kolben der Spritze werden die Lösungen durch mehrmaliges automatisches Auf- und Abziehen vermischt. Die Umsetzung der Aminosäuren mit dem OPA-Reagenz erfolgt noch in der Spritze. Schließlich wird die Lösung, die nun die derivatisierten Aminosäuren enthält, zur chromatographischen Bestimmung auf die Säule gegeben.

#### HPLC-Trennbedingungen

Gerätekombination: HPLC 1 (vg. 6.8.1.1) mit HP 1100 Series Fluorescence Detektor  
(Hewlett Packard, Waldbronn)

Säule: AminoQuant (200 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 5 µm)  
(Hewlett-Packard, Waldbronn)

Säulentemperatur: 40 °C

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 40 min

Mobile Phase A: Triacetat-Pufferlösung

Mobile Phase B: Acetonitril- Triacetat-Puffergemisch

Gradient: von 15 % B auf 30 % B in 15 min,

von 30 % B auf 70 % B in 15 min,

von 70 % B auf 100 % B in 5 min,

5 min isokratisch bei 100 % B

von 100 % B auf 15 % B in 5 min

jeweils lineare Gradienten

Fluss: 0,45 ml/min (konstant über die Laufzeit)

Injektionsvolumen: 7 µl

Detektion: Anregungslicht: 340 nm

Fluoreszenzlicht: 450 nm

HPLC: HP 1100 (Hewlett-Packard, Waldbronn)

Säule: AminoQuant (200 mm x 2,1 mm, Partikelgröße 5 µm)  
(Hewlett-Packard, Waldbronn)

Säulentemperatur: 40 °C

Eluent: Gradientenelution, Laufzeit 50 min

Acetonitril/Ammoniumformiat (30 mmol,pH=3,5) (10/90; v/v)

Acetonitril/Ammoniumformiat (30/70; v/v)

Fluss: 0,45 ml/min (konstant über die Laufzeit)

Injektionsvolumen: 7 µl

Detektion: Anregungslicht: 340 nm

Fluoreszenzlicht: 450 nm

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Abdulkarim, B.G., Smith, S.J.:  
J.Agric. Food Chem., **46**, 4680-4687 (1998)
- [2] Abrahams, A., Lowy, P.H., Borsook, H.:  
J. Am. Chem. Soc., **77**, 4794 (1955)
- [3] Adamson, R.H.:  
Cancer Prevention, 1-7 (1990)
- [4] Ahmed, M.U., Thorpe, S.R., Baynes, J.W.:  
J. Biol. Chem., **261**, 4889-4894 (1986)
- [5] Ahrens, M., Schulte, E., Weber, K.:  
Fat Sci. Technol, **96**, 67 (1994)
- [6] Ainsley, J.F., Morgan, E.D., Poole, C.F.:  
Organic Mass Spectrometry, **13**, 671-673 (1978)
- [7] Amadori, M.:  
Atti R. Accad. Lincei, **13**, 72 (1931)
- [8] Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E.:  
Mutation Res., **31**, 347-364 (1975)
- [9] Anet, E.F.L.J., Reynolds, T.M.:  
Aust. J. Chem., **10**, 182 (1957)
- [10] Anet, E.F.L.J.:  
Aust. J. Chem., **13**, 396 (1960)
- [11] Anet, E.F.L.J.:  
Carbohyd. Res., **19**, 181 (1964)
- [12] Angrick, M., Rewicki, D.:  
Chemie in unserer Zeit, **5**, 149-156 (1980)
- [13] Arnoldi, A., Arnoldi, C., Baldi, O., Griffini, A.:  
J. Agric. Food Chem., **36**, 988-992 (1988)
- [14] Aromenverordnung vom 22.12.1981, zuletzt geändert am 18.06.2001,  
Bundesgesetzblatt der Bundesrepublik Deutschland, 1625/77
- [15] Arvidsson, P., van Bockel, M.A.J.S., Skog, K., Jägerstad, M.:  
J. Food Sci., **62**, 911-916 (1997)
- [16] Baltes, W.:  
Lebensmittelchemie, **47**, 9 (1993)
- [17] Barnes, W.S., Maher, J.C., Weisburger, J.H.:  
J. Agric. Food Chem., **31**, 883 (1983)
- [18] Becher, G., Knize, M.G., Felton, J.S.:  
Vår Föda, **42**, 85-90 (1989)
- [19] Becher, G., Knize, M.G., Nes, I.F., Felton, J.S.:  
Carcinogenesis, **9**, 247-253 (1988)
- [20] Beck, J., Ledl, F., Severin, T.:  
Carbohydr. Research, **117**, 240 (1988)



- [21] Beksan, E., Schieberle, P., Robert, F., Blank, I., Fay, L., Schlichtherle-Cerny, H., Hofmann, T.:  
J. Agric. Food Chem, **51**, 5428-5436 (2003)
- [22] Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, ISBN 3-540-41096-1, Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage, 24-28 (2001)
- [23] Belitz H.D., Grosch W., Schieberle P.: Lehrbuch der Lebensmittelchemie, ISBN 3-540-41096-1 Springer-Verlag, Berlin, 5. Auflage, 269 (2001)
- [24] Biermann, C.J., Carol, M.K., Marlett, J.A., Steele, R.D.:  
J. Chromatogr., **357**, 330-334 (1986)
- [25] Bjeldanes, L.F., Morris, M.M., Timurain, H., Hatch, F.T.:  
J. Agric. Food Chem., **31**, 18-21 (1983)
- [26] Blank, I., Fay, I.B.:  
J. Agric. Food Chem., **44**, 531-536 (1996)
- [27] Blau, K. (Hrsg.), Halket, J.:  
Handbook of Derivatives for Chromatography, 2. Auflage, ISBN 0-471-92699-X, Wiley, Chichester, 1993
- [28] Bross, C., Springer, S., Sontag, S.:  
Dtsch. Lebensm. Rdsch, **93**, 384 (1997)
- [29] Brüggemann, J, Erbersdobler, K.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **137**, 137-143 (1968)
- [30] Chen, B.H., Yang, D.J.:  
Chrotophographia, **48**, 223-230 (1998)
- [31] Ciner-Doruk, M., Eichner, K.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **168**, 9 (1979)
- [32] Coleman, W.M.:  
J. Chromatogr. Sci., **37**, 583 (1999)
- [33] Commoner, B., Vitayathil, A.J., Dolara, P., Nair, G., Madyastha, P., Cuca, G.C.:  
Science, **201**, 913 (1978)
- [34] Deutsches Ärzteblatt, Ausgabe vom 21.6.2002
- [35] DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln (SKLM):  
Beschluss „Heterocyclische Amine (Imidazolquinoline)“ vom 14./15.12.1998
- [36] Doerge, D.R., Holder, C.L., Preece, S.:  
in: Proceedings of the 44<sup>th</sup> ASMS conference on mass spectrometry and allied topics, Portland, Oregon, 208 (1996)
- [37] Doll, R., Peto, R.:  
J Natl. Cancer Inst., **66**, 1191-1308
- [38] Donike, M., Zimmermann, J.:  
J. Chromatogr., **202**, 483 (1980)
- [39] Edmonds, C.G., Sethi, S.K., Yamaizumi, Z., Kasai, H., Nishimura, S., McCloskey, A.:  
Environ. Health. Perspect., **67**, 35-40 (1986)

- [40] Eichner K.:  
in: Autoxidation in Food and Biological Systems (Simic, M.G., Karel, M.; Hrsg.), ISBN 0-306-40561-X, Plenum Press, New York, 367-385 (1980)
- [41] Eichner, K., Laible, R., Wolf, W.:  
in: Properties of Water in Foods (Simatos, D., Multon, J.L.; Hrsg.), ISBN 90-247-3153-4, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 191 (1985)
- [42] Eichner, K., Schuirmann, E.:  
in: Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health (Labuza, T.P.; Hrsg.), ISBN 0-85186-802-9, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **151**, 153-158 (1994)
- [43] Eichner, K.:  
Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem., **36**, 101 (1982)
- [44] Eichner, K.:  
in: Water Relations of Foods (Duckworth, Hrsg.), ISBN 0-12-223150-3, Academic Press, London, 417-419 (1975)
- [45] Eisenbrand, G., Tang, W.:  
Toxicology, **84**, 1-82 (1993)
- [46] El Khadem, H., Horton, D., Meshreki, M.H., Nashed, M.A.:  
Carbohydr. Res., **13**, 317 (1970)
- [47] El Khadem, H., Horton, D., Meshreki, M.H., Nashed, M.A.:  
Carbohydr. Res., **17**, 183 (1971)
- [48] El Khadem, H., Horton, D., Meshreki, M.H., Nashed, M.A.:  
Carbohydr. Res., **22**, 381 (1972)
- [49] Robert, F., Blank, I., Fay, L. B., Beksan, E.; Hofmann, T., Schieberle, P.:  
in: Challenges in Taste Chemistry and Biology, ACS Symposium Series, **847**, 195-209 (2004)
- [50] Fay, L.B., Ali, S., Gross, G.A.:  
Mutat. Res., **376**, 29-35 (1997)
- [51] Feather, M.S., Harris, J.F.:  
Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., **28**, 161-224 (1973)
- [52] Felton, J. S.; Knize, M.G.:  
Progress in Clinical and Biological Research, **247**, 19-38 (1990)
- [53] Felton, J.S, Knize, M.G., Shen, N.H., Lewis, P.R., Andresen, B.D. Happe, J., Hatch, F.T.:  
Carcinogenesis, **7**, 1081-1086 (1986)
- [54] Felton, J.S., Fultz, E., Dolbeare, F.A., Knize, J.S.:  
Food Chem. Toxicol., **32**, 897-902 (1994)
- [55] Felton, J.S., Jägerstad, M., Knize, M.G., Skog, K., Wakabayshi, K.:  
in: Food Borne Carcinogens: Heterocyclic Amines (Nagao, M., Sugimura, T.; Hrsg.), ISBN 0-471-98399-3, John Wiley & Sons, West Sussex, 31-72 (2000)
- [56] Felton, J.S., Knize, M.G., Wood, C., Wuebbels, B.J., Healy, S.K., Stürmer, D.H., Bjeldanes, L.F., Kimble, B.J., Hatch, F.T.:  
Carcinogenesis, **5**, 95-102 (1984)

- [57] Felton, J.S., Knize, M.G.:  
in: Mutagens in Food: Detection and Prevention (Hayatsu, H.; Hrsg.),  
ISBN 0-8493-5877-9, CRC Press, Boca Raton (Florida), 57-66 (1991)
- [58] Felton, J.S., Knize, M.G.:  
Mutation Res., **259**, 205-217 (1991)
- [59] Fink-Gremmels, J.:  
Veterinary Quarterly, **21**, 115-120 (1999)
- [60] Frank, O.:  
Charakterisierung von Bräunungsprodukten und Bitterstoffen aus Kohlenhydrat/Aminosäure-Reaktionen mittels instrumentell-analytischer und sensorischer Techniken, Dissertation TU-München, 2002
- [61] Friesen, M.D., Garren, L., Bereziat, J.C., Kadlubar, F., Lin, D.:  
Environ Health Perspectives, **99**, 199 (1993)
- [62] Funcke, W., von Sonntag, C.:  
Carbohydr. Res., **69**, 247-251 (1979)
- [63] Galceran, M.T., Moyano, E., Puignou, L., Pais, P.:  
J. Chromatogr. A, **730**, 185-194 (1996)
- [64] Galceran, M.T., Pais, P., Puignou, L.:  
J. Chromatogr. A, **719**, 203 (1996)
- [65] Glomb, M.A., Pfahler, C.:  
Lebensmittelchemie, **53**, 16-17 (1999)
- [66] Glomb, M.A., Pfahler, C.:  
Carbohydr. Res., **329**, 515-523 (2000)
- [67] Glomb, M.A.:  
Proteinmodifikation durch  $\alpha$ -Dicarbonylstrukturen, ein Beitrag zur Maillard-Reaktion, kumulierte Habilitation, TU-Berlin, 2001
- [68] Glomb, M.A.:  
Synthese, Strukturaufklärung und Nachweis reaktiver Pentoseabbauprodukte: ein Beitrag zur Maillard-Reaktion, Dissertation Universität Stuttgart, 1992
- [69] Goldbeck, C.:  
..., Dissertation WWU Münster, 2004
- [70] Goldman, R., Shields, P.G.:  
Journal of Nutrition, **133(3S)**, 965-973 (2003)
- [71] Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K., Jägerstad, M.:  
Mutation Res., **151**, 177-183 (1985)
- [72] Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K.:  
Food Chem., **20**, 127 (1986)
- [73] Grivas, S., Nyhammar, T.:  
Mutation Res., **142**, 5 (1985)
- [74] Gross, G.A., Grüter, A., Heyland, S.:  
Food Chem. Toxicol., **30**, 491 (1992)
- [75] Gross, G.A., Grüter, A.:  
J. Chromatogr., **592**, 271-278 (1992)

- [76] Gross, G.A., Turesky, R.J., Fay, L.B., Stillwell, W.G., Skipper, P.L., Tannenbaum, S.R.:  
Carcinogenesis, **14**, 2313-2318 (1993)
- [77] Gross, G.A.:  
Carcinogenesis, **11**, 1597-1603 (1990)
- [78] Hagraves, W.A., Pariza, M.W.:  
Cancer Research, **43**, 1467-1472 (1983)
- [79] Hashiba, H.:  
Agric. Biol. Chem., **42**, 1727-1731 (1978)
- [80] Hashiba, H.:  
J. Agric. Food. Chem., **24**, 70-74 (1976)
- [81] Hatch, F.T., Felton, J.S., Stürmer, D.H., Bjeldanes, L.F.:  
in: Chemical Mutagens 9 (De Serres, F.J.; Hrsg.), ISBN 0-306-41696-4,  
Plenum Press, New York, 111-164 (1984)
- [82] Hatch, F.T., Knize, M.G., Healy, S.K., Slezak, T., Felton, J.S.:  
Environ. Mol. Mutagen, **12**, 1 (1988)
- [83] Hatch, F.T.:  
Environ. Health Persp., **67**, 93 (1986)
- [84] Hayashi, T., Namiki, M.:  
Agric. Biol. Chem., **44**, 2575-2580 (1980)
- [85] Hayatsu, H., Matsui, Y., Ohara, Y., Oka, T., Hayatsu, T.:  
Gann, **74**, 472 (1983)
- [86] Hayatsu, H., Oka, T., Wakata, A., Ohara, Y., Hayatsu, T., Kobayashi, H.,  
Arimoto, S.:  
Mutation Res., **119**, 233-238 (1983)
- [87] Heinzler, M.:  
Vorkommen von Amadori-Verbindungen in Kakao und ihre Bedeutung als  
Aromavorstufen, Dissertation WWU Münster, 1990
- [88] Heiss, R., Eichner, K.:  
Haltbarmachung von Lebensmitteln, 4. Auflage, ISBN 3-540-43137-3,  
Springer-Verlag, Berlin 2002
- [89] Herbreteau, B.:  
Analisis, **20**, 355-374 (1992)
- [90] Herderich, M.:  
Den Unbekannten auf der Spur: Lebensmittel und Naturstoffanalytik mittels HPLC-  
MS/MS, Habilitation Universität Würzburg, 1998
- [91] Heumann, K.G.:  
Fresenius Z. Anal. Chem., **325**, 661-665 (1986)
- [92] Heyns, K., Müller, G., Paulsen, H.:  
Justus Liebig's. Ann Chem., **703**, 202 (1967)
- [93] Heyns, K., Noak, H.:  
Chem. Ber., **95**, 720 (1962)
- [94] Heyns, K., Paulsen, R., Eichstedt, M., Rolle, M.:  
Chem Ber., **90**, 2039 (1957)

- [95] Hicks, K.B.:  
in: Carbohydrate Analysis – High Performance Liquid Chromatography and capillary Electrophoresis (Ziad El Rassi, Hrsg.), ISBN 0-444-89981-2, Elsevier, Amsterdam, 361-383 (1995)
- [96] Hodge, J.E.:  
J. Agric. Food Chem., **1**, 928-943 (1953)
- [97] Hofmann T.:  
in: Melanoidins in Food and Health - Volume 1 (Ames, J.M.; Hrsg.), ISBN 92-894-0247-4, Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 31-43 (2001)
- [98] Hofmann, T., Bors, W., Stettmeier, K.J.:  
J. Agric. Food Chem., **47**, 379-390 (1999)
- [99] Hofmann, T.:  
Eur. Food Res. Technol., **209**, 113-121 (1999)
- [100] Hofmann, T.:  
J. Agric. Food Chem. **46**, 932-940 (1998)
- [101] Hofmann, T.:  
J. Agric. Food Chem., **46**, 3918-3928 (1998)
- [102] Hofmann, T.:  
Carbohydr. Res., **313**, 203-213 (1998)
- [103] Hofmann, T.:  
Carbohydr. Res., **313**, 215-224 (1998)
- [104] Hollnagel, A., Kroh, L.W.:  
J. Agric. Food Chem., **50**, 1659-1664 (2002)
- [105] Hübschmann, H.J.:  
Labor Praxis, **10**, 808 (1990)
- [106] Hübschmann, H.J.:  
Chemische Ionisation an Ion-Trap-Massenspektrometern, Firmenschrift  
Fa.Axel Semrau GmbH, Sprockhövel, 1993
- [107] Hughes, R.B.:  
J. Sci. Food Agric., **11**, 700-705 (1960)
- [108] Iglesias, H.A., Chirife, J.:  
Handbook of Food Isothermes: Water sorption Parameters for Food and Food Components, ISBN 0-12-370380-8, Academic Press, New York, 1982
- [109] Ishizu, A., Lindberg, B., Theander, O.:  
Acta Chem Scand., **21**, 8 (1967)
- [110] Jackson, L. S., Hargraves, W.A., Stroup, W.H., Diachenko, G.W.:  
Mutation Res., **320**, 113-124 (1994)
- [111] Jägerstad, M., Laser Reuterswärd, A, Olsson, R., Grivas, S., Nyhammar, T., Olsson, K., Dahlquist, A.:  
Food Chemistry, **12**, 255-264 (1983)

- [112] Jägerstad, M., Laser Reuterswärd, A., Öste, R., Dahlquist, A., Grivas, S., Olsson, K., Nyhammar, T.:  
in: ACS Symposium Series 215, The Maillard Reaction in Foods and Nutrition, American Chemical Society, Washington, 507-519 (1983)
- [113] Jägerstad, M., Reuterswärd, A.L., Öste, R., Dahlquist, M.:  
*Agric. Biol. Chem.*, **44**, 671 (1980)
- [114] Jägerstad, M., Skog, K., Arvidsson, p., Solyakov, A.:  
*Food Res. Technol.*, **207**, 419 (1998)
- [115] Jägerstad, M., Skog, K., Grivas, S., Olsson, K.:  
*Mutation Res.*, **259**, 219-223 (1991)
- [116] Jägerstad, M., Olsson, K., Laser Reuterswärd, A., Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T.:  
*Mutation Res.*, **126**, 239-244 (1984)
- [117] Johansson, M.A.E, Fay, L.B., Gross, G.A., Olsson, K., Jägerstad, M.:  
*Carcinogenesis*, **16**, 2553-2560 (1995)
- [118] Johansson, M.A.E, Fredholm, L., Bjerne, I., Jägerstad, M.:  
*Food Chem. Toxicol.*, **33**, 993-1004 (1995)
- [119] Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.:  
*Food Chem.*, **56**, 69 (1996)
- [120] Johansson, M.A.E.:  
Influence of Lipids, and Pro-and Antioxidants on the Yield of Carcinogenic Heterocyclic Amines in Cooked Foods and Model Systems,  
Dissertation Universität Lund, 1995
- [121] Jones, R.C., Weisburger, J.H.:  
*Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 222-230 (1988)
- [122] Kasai, H., Nishimura, S., Nagao, M., Takahashi, A., Sugimura, T.:  
*Cancer Letters*, **7**, 343 (1979)
- [123] Kataoka, H., Kijima, A.:  
*J. Chromatogr. A.*, **767**, 187 (1997)
- [124] Kataoka, H.:  
*J. Chromatogr. A.*, **774**, 121-142 (1997)
- [125] Kato, H., Fujimaki, M.:  
*J. Food Sci.*, **33**, 445-449 (1968)
- [126] Kato, H.:  
*Agr. Biol Chem*, **26/3**, 187-192 (1962)
- [127] Kato, H.:  
*Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **24**, 1-12 (1960)
- [128] Kato, T., Kikugawa, K., Asanoma, M., Sakagabe, Y.:  
*Mutation Res.*, **240**, 259-266 (1990)
- [129] Kawakishi, S., Cheng, R.Z., Sato, S., Uchida, K.:  
in: Maillard Reactions in Chemistry, Food and Health (Labuza; Hrsg), ISBN 0-85186-802-9, The Royal Chemistry Society, Cambridge, 281-285 (1994)
- [130] Kawakishi, S., Tseuehiro, J., Uchida, K.:  
*Carbohydr. Res.*, **211**, 167-171 (1991)

- [131] Kebarle, P., Tang, L.:  
Anal. Chem., **65**, 972-986 (1995)
- [132] Kennedy, I.A., Hemscheidt, T., Britten, J.F., Spenser, I.D.:  
Can. J. Chem., **73**, 1329-1337 (1995)
- [133] Kieninger H., Biková V.:  
Mitt. Vers. Stat. Gär. Gew., **27**, 212 (1973)
- [134] Kikugawa, K., Hiramoto, K., Kato, T., Yanagawa, H.:  
Mutation Res., **465**, 183-190 (2000)
- [135] Knapp, D.R.:  
Handbook of Analytical Derivatization Reactions, ISBN 0-471-03469-X,  
Wiley, New York, 1979
- [136] Knize, M.G., Cunnigham, P.L., Avila, J.R., Jones, A.L., Griffin, E.A., Felton, J.S.:  
Food Chem. Toxicol., **32**, 55-60 (1994)
- [137] Knize, M.G., Dolbeare, F.A., Carroll, K.L., Moore, D.H., Felton, J.S.:  
Food Chem. Toxicol., **32**, 595-603 (1994)
- [138] Knize, M.G., Felton, J.S., Gross, G.A.:  
J. Chromatogr., **624**, 253-265 (1992)
- [139] Knize, M.G., Hopmans, E., Happe, J.A.:  
Mutation Res., **260**, 313 (1991)
- [140] Knize, M.G., Salmon, C.P., Hopmans, E.C., Felton, J.S.:  
J. Chromatogr. A, **763**, 179-185 (1997)
- [141] Knize, M.G., Shen, N.H., Felton, J.S.:  
Mutagenesis, **3**, 503-508 (1988)
- [142] Knize, M.G., Sinha, R., Brown, E.D., Salmon, C.P., Levander, O.A.,  
Felton, J.S., Rothman, N.:  
J. Agric. Food Chem., **46**, 4648-4651 (1998)
- [143] Köhler, P.E., Odell, G.V.:  
J. Agric. Food Chem., **18**, 895-898 (1970)
- [144] Köhler, P.E., Mason, M.E., Newell, J.A.:  
J. Agric. Food Chem., **17**, 393-396 (1969)
- [145] Krach, C., Rauter, S., Sonntag, G., Löw, H., Murkovic, M., Pfannhauser, W.:  
in: Current Status and Future Trends in Analytical Food Chemistry  
(Sontag, G., Pfannhauser, W.; Hrsg.), ISBN 3-900554-17-X,  
Proc. Euro Food Chem. VII, Austrian Chem. Soc., Wien, 419-422 (1995)
- [146] Kubo, T., Urano, K., Utsumi, H.:  
J. of Health Science, **48**, 545-554 (2002)
- [147] Kuhn, R., Weygand F.  
Ber. Dtsch. Chem. Ges., **70**, 769-772 (1937)
- [148] Kurosaka, R., Wakabayashi, K., Ushiyama, H., Nukaya, H., Arakawa, N.,  
Nagao, M., Sugimura, T.:  
Jap. J. of Cancer Res., **83**, 919-922 (1992)
- [149] Laser Reuterswärd, A., Skog, K., Jägerstad, M.:  
Food Chem. Toxicol., **25**, 755-762 (1987)

- [150] Layton, D.W., Bogen, K.T., Knize, M.G., Hatch, F.T., Johanson, V.M., Felton, J.S.:  
Carcinogenesis, **16**, 39-52 (1995)
- [151] Ledl F., Schleicher E.,  
Angew. Chemie, **102**, 597-626 (1990)
- [152] Ledl, F., Beck, J., Severin, T.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **188**, 118 (1989)
- [153] Ledl, F., Severin, T.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **167**, 410-413 (1978)
- [154] Lee, H., Jiaan, C.Y., Tsai, S.J.:  
Food Chemistry, **45**, 235-238 (1992)
- [155] Lee, H., Lin, M.-Y., Chan, S.-C.:  
Mutation Research., **308**, 77-88 (1994)
- [156] Lee, H., Lin, M.-Y.; Hao, N.J.:  
Mutagenesis, **10**, 179-83 (1995)
- [157] Lee, H., Tsai, S.-J.:  
Food Chem. Toxicol., **29**, 517 (1991)
- [158] Lees, G.J., Jago, G.R.:  
J. Dairy Res., **43**, 75-83 (1976)
- [159] Liedke, R.:  
Bildung von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen beim Abbau von Amadori-  
Umlagerungsprodukten, Dissertation WWU-Münster, 2000
- [160] Liu, S., Stampfer, F.B., Hu, B., Giovannucci, E., Rimm, E., Manson, J.E.,  
Hennekens, C.H., Willett, W.:  
Am. J. Clin. Nutr., **70**, 412-419 (1999)
- [161] Loncin, M., Jaqumain D., Tutundjian-Provost, A.M., Lenges, J.P., Bimbenet, J.J.:  
CR Acad. Sci. Paris, **260**, 3208-3211 (1960)
- [162] Loprieno, N., Boncristiani, G., Loprieno, G.:  
Food Chem. Toxicol., **29**, 377 (1991)
- [163] Machell, G., Richards, N.:  
J. Chem. Soc., **1960**, 1924 (1960)
- [164] Madson, M.A., Feather, M.S.:  
Carbohydr. Res., **94**, 183 (1981)
- [165] Maga, J.A.:  
Food Reviews International, **8(4)**, 479-558 (1992)
- [166] Maillard, L.C.:  
Comptes rendus, **154**, 66-68 (1912)
- [167] Malfatti, M.:  
Carcinogenesis, **20**, 705 (1999)
- [168] Manabe, H., Suzuki, S., Wada, O., Ueki, A.:  
Carcinogenesis, **14**, 899 (1993)
- [169] Manabe, S, Wada, O., Kanai, Y.:  
Environ. Sci, **11**, 11-19 (1991)



- [170] Manabe, S., Kurihara, N., Shibutani, T., Wada, O., Uecki, A., Suzuki, H.:  
Carcinogenesis, **14**, 903 (1993)
- [171] Manabe, S., Kurihara, N., Wada, O., Izumikawa, S., Asakuno, K., Morita, M.:  
Environ. Poll., **80**, 281-296 (1993)
- [172] Manabe, S., Kurihara, N., Wada, O., Tohyama, K., Aramaki, T.:  
Carcinogenesis, **13**, 827 (1992)
- [173] Manabe, S., Suzuki, H., Wada, O., Keki, A.:  
Carcinogenesis, **14**, 889-901 (1993)
- [174] Manabe, S., Tahyama, K., Wada, O., Aramaki, T.:  
Carcinogenesis, **12**, 1945-1947 (1991)
- [175] Manabe, S., Uchino, E., Wada, O.:  
Mutation Res., **226**, 215-221 (1989)
- [176] Manabe, S., Wada, O., Kanai, Y.:  
Environ. Sci., **1**, 11-19 (1991)
- [177] Manabe, S.:  
Jpn. J. Hyg., **46**, 867-873 (1992)
- [178] Marko, D., Habermeyer, M., Kemény, M., Weyand, U., Niederberger, E.,  
Frank, O., Hofmann, T.:  
Chem. Res. Toxicol., **16**, 48-55 (2003)
- [179] Maron, D.M., Ames, B.N.:  
Mutation Res., **113**, 173-215 (1983)
- [180] Matsomoto, T, Yoshida D., Tomita, H.:  
Cancer Letters, **12**, 105-110 (1981)
- [181] Mauron, J.:  
in: Maillard Reactions in Foods, Prog. Food Nutr. Sci. 5 (Eriksson, C.; Hrsg.),  
ISBN 0-08-025496-9, Pergamon Press, Oxford, 5-35 (1981)
- [182] Mawhinney, T.P., Madson, M.A.:  
J. Org. Chem., **47**, 3336-3339 (1982)
- [183] Mawhinney, T.P., Robinett, R.S.R., Atalay, A., Madson, M.A.:  
J. Chromatogr., **358**, 231-342 (1986)
- [184] Mersch-Sundermann, V., Reinhardt, A., Emig, M.:  
Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, **198**, 429-442 (1996)
- [185] Meyer, V.R.:  
Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, ISBN 3-7935-5452-X,  
7. Auflage, Verlag Salle und Sauerländer, Frankfurt (Main), 74-75 (1992)
- [186] Mili, B.L., Djilas, S.M., Canadanovi, -Brunet, J.M.:  
Food Chem., **46**, 273-276 (1993)
- [187] Miller, A.J., Buchanan, R.L.:  
J. Food Sci., **48**, 1772-1775 (1983)
- [188] Milon, H, Bur, H., Turesky, R.J.:  
J. Chromatogr., **394**, 210 (1987)
- [189] Moll, N., Gross, B.:  
Journal of Chromatography, **206**, 186-192 (1981)

- [190] Molnár-Perl, I., Horváth, K.:  
Chromatographia, **45**, 321-326 (1997)
- [191] Morita, N., Daido, Y., Hayashi, H., Takagi, M.:  
Agric. Biol. Chem., **47**, 765 (1983)
- [192] Morita, N., Mizutani, M., Hayashi, K., Kirihata, M., Ischimoto, I.,  
Ueda, H., Takagi, M.:  
Bull. Univ. Osaka Prefect. Ser. B, **35**, 59 (1983)
- [193] Morita, N., Takagi, M.:  
in: Aminocarbonyl Reactions in Food and Biological Systems (Fujimaki, M.; Hrsg.),  
ISBN 0-444-99510-2 4-06-202367-9, Kodansha LTD, Tokyo 59 (1986)
- [194] Morita, N., Takagi, M.:  
Bull. Univ. Osaka Prefect. Ser. B, **24**, 59-65 (1972)
- [195] Munson, M.S.B., Field, F.H.:  
J. Am. Chem. Soc., **88**, 2621-2630 (1966)
- [196] Muramatsu, M., Matsushima, T.:  
Mutation Res., **147**, 266-267 (1985)
- [197] Murkovic, M., Friedrich, M., Pfannhauser, W.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch. A, **205**, 347 (1997)
- [198] Murray, S., Davies, D.S.:  
Biomed. Mass. Spectrom., **11**, 435-440 (1984)
- [199] Murray, S., Gooderham, N.J., Boobis, A.R., Davies, D.S.:  
Carcinogenesis, **9**, 321-325 (1988)
- [200] Murray, S., Lynch, A.M., Knize, M.G., Gooderham, N.J.:  
J. Chromatogr., **616**, 211-219 (1993)
- [201] Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sugimura, T.:  
Cancer Letters, **2**, 335-340 (1977)
- [202] Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sugimura, T.:  
Cancer Letters, **2**, 221-226 (1977)
- [203] Namiki, M., Hayashi, T.:  
J. Agric. Food Chem., **23**, 487-491 (1975)
- [204] Namiki, M.:  
Advances in Food Research, **32**, 115-184 (1988)
- [205] Nedvidek, W., Ledl, F., Fischer, P.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **194**, 222-228 (1992)
- [206] Nedvidek, W.:  
Zuckerabbauprodukte mit  $\alpha$ -Dicarbonylstruktur, Bildung in Abhängigkeit von den  
Reaktionsbedingungen, Nachweis und Strukturaufklärung von Folgeprodukten,  
Dissertation Universität Stuttgart, 1992
- [207] Negishi, C., Wakabayashi, K., Tsuda, M., Sato, S., Sugimura, T., Saito, H.,  
Maeda, M., Jägerstad, M.:  
Mutation Res., **140**, 55-59 (1984)

- [208] Negishi, C., Wakabayashi, K., Yaimaizumi, Z., Saito, S., Sugimura, T., Jägerstad, M.:  
Mutation Res., **147**, 267-268 (1985)
- [209] Nes, I.F.:  
Mutation Res., **175**, 145-148 (1986)
- [210] Nissen, W.M.A., Tinke, A.P.:  
J. Chromatogr. A., **703**, 37-57 (1995)
- [211] Nissen, W.M.A.:  
J. Chromatogr. A., **794**, 407-435 (1998)
- [212] Nukaya, H., Wantanabe, H., Ishida, H., Tsuji, K., Suwa, Y., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Kosuge, T.:  
Chem. Bull. Pharm., **39**, 533-535 (1991)
- [213] Nutt, S.:  
Entwicklung von Methoden zur Bestimmung von mutagenen heterocyclischen Aminen in Reaktionsaromen, Dissertation WWU-Münster, 1996
- [214] Nyhammar, T., Grivas, S., Olsson, K., Jägerstad, M.:  
in: Amino-Carbonyl Reactions in Food and Biological Systems (Fujimaki, X., Namiki, X., Kato, X.; Hrsg.), ISBN 0-444-99510-2, Elsevier, Amsterdam, 323 (1986)
- [215] Nyhammar, T.:  
Studies on the Maillard Reactions and its role in the formation of food mutagens, Dissertation Universität Uppsala 1986
- [216] Odani, H., Shinzato, T., Matsumoto, Y., Usami, J., Maeda, K.:  
Biochem. Biophys. Res. Commun., **256**, 89-93 (1999)
- [217] Ohgaki, H., Takayama, S., Sugimura, T.:  
Mutation Res., **259**, 399-410 (1991)
- [218] Olsson, J., Dyremark, A., Karlberg, B.:  
J. Chromatogr. A., **765**, 329-335 (1997)
- [219] Övervik, E., Kleman, M., Berg, I., Gustafson, J.-A.:  
Carcinogenesis, **10**, 2293-2301 (1989)
- [220] Pais, P.J., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T.:  
J. Chromatogr. A., **778**, 207-218 (1997)
- [221] Parihar, D.B., Vasundhara, T.S., Kumudavalli, K.V., Vijayaraghavan, P.K.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **173**, 204-207 (1981)
- [222] Pearson, A.M., Chen, C., Gray, J.I., Aust, S.D.:  
Free Rad. Biol. Med., **13**, 161-167 (1992)
- [223] Perfetti, G.A.:  
J. AOAC Int., **79**, 813 (1996)
- [224] Petersson, G.  
Carbohydr. Res., **33**, 47-81 (1974)
- [225] Piloty, M., Baltes, W.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **168**, 368-373 (1979)
- [226] Poole, C.F., Zlatkis, A.:  
J. Chromatogr. Sci., **17**, 115-123 (1979)

- [227] Popoff, T., Theander, O.:  
Carbohydr. Res., **22**, 135 (1972)
- [228] Poy, F., Visiani, S., Terrosi, F.:  
J. Chromatogr., **217**, 81-90 (1981)
- [229] Puignou, L., Casal, J., Santos, F.J., Galceran, M.T.:  
J. Chromatogr. A, **769**, 293-299 (1997)
- [230] Reistad, R., Rossland, O. J., Latva-Kala, K. J., Rasmussen, T., Vikse, R.,  
Becher, G., Alexander, J.:  
Food Chem. Toxicol., **35**, 945 (1997)
- [231] Renman, L., Jagner, D.:  
Analytica Chimica Acta, **357**, 157-166 (1997)
- [232] Reutter, M., Eichner, K.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **188**, 28 (1989)
- [233] Richling, E., Häring, D., Herderich, M., Schreier, P.:  
Chromatographia, **48**, 258 (1998)
- [234] Richling, E., Kleinschnitz, M., Schreier, P.:  
Eur. Food Res. Technol., **210**, 68-72 (1999)
- [235] Richling, E.:  
Analytik von heterocyclischen aromatischen Aminen mittels  
Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC-MS/MS),  
Dissertation Universität Würzburg, 1999
- [236] Rockland, L.B.:  
Analytical Chemistry, **32**, 1375-1376 (1960)
- [237] Rodrigues, J.A., Baros, A.A., Rodrigues, P.G.:  
J. Agric. Food Chem., **47**, 3219-3222 (1999)
- [238] Roeper, H., Roeper, S., Heyns, K.:  
Carbohydr. Res., **116**, 183 (1983)
- [239] Roussev, M.:  
Nichtenzymatische Bräunungsreaktionen von D-Glucose und D-Fructose: Bildung  
und Nachweis von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in Modellsystemen und Lebensmit-  
teln, Dissertation TU-Berlin, 2003
- [240] Salmon, C.:  
Food Chem. Toxicol., **35**, 433 (1997)
- [241] Salomon, L., Burns, J., King, C.:  
Am. Chem. Soc., **74**, 5161 (1952)
- [242] Scherz, H., Bonn, G.:  
Analytical Chemistry of Carbohydrates, ISBN 3-13-102351-1, Thieme-Verlag, Am-  
sterdam, 123-184 (1998)
- [243] Scheutwinkel-Reich, M., Resse, G., van der Hude, W.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **180**, 207 (1985)
- [244] Schleicher, E., Scheller, R., Wieland, O.H.:  
Biophys. Res. Commun., **99**, 1011 (1981)

- [245] Schuirmann, E., Eichner, K.:  
in: Strategies for Food Quality Control and Analytical Methods in Europe,  
proceedings of the 6. European Conference on Food Chemistry, Hamburg,  
22 – 26. September 1991 (Baltes, W., Eklund, T., Fenwich, R., Pfannhauser, W.,  
Ruiter, A., Thier, H.-P.; Hrsg.), Behrs' s Verlag, Hamburg, 739-744 (1991)
- [246] Schuirmann, E.:  
Bildung und Nachweis von mutagenen heterocyclischen Aminen beim Erhitzen von  
wasserarmen Modellsystemen und Fleischerzeugnissen,  
Dissertation WWU-Münster, 1992
- [247] Schulte, E.:  
Lebensm. Chem. Gerichtl. Chem., **42**, 1-3 (1988)
- [248] Schulz, H.-J.:  
Analyse pharmakologisch relevanter Substanzen mit GC/MSD EI/PCI/NCI,  
Firmenschrift Fa. Agilent Deutschland GmbH, München, 2001
- [249] Schwarzenbach, R., Gubler, D.:  
J. Chromatogr., **491**, 624 (1991)
- [250] Schwedt, G.:  
Taschenatlas der Analytik, ISBN 3-527-30870-9, 5. Auflage,  
Thieme Verlag, Stuttgart, 2002
- [251] Severin, T., Kröning, U.:  
Mikrobiol. Technol. Lebensm., **1**, 156-157 (1972)
- [252] Severin, T., Seilmeier, W.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **134**, 230-232
- [253] Shioya, M., Wakabayashi, K., Sato, S., Nagao, M., Sugimura, T.:  
Mutation Res., **191**, 133-138 (1987)
- [254] Sinha, R., Rothman, N., Brown, E.D., Salomon, C.P., Knize, M.G., Swanson, C.A.,  
Rossi, S.C., Mark, S.D., Levander, O.A., Felton, J.S.:  
Cancer Res., **55**, 4516-4519 (1995)
- [255] Sinha, R., Rothman, N., Salomon, C.P., Knize, M.G., Brown, E.D., Swanson, C.A.,  
Rhodes, D., Rossi, S.C., Felton, J.S., Levander, O.A.:  
Food Chem. Toxicol., **36**, 279-287 (1998)
- [256] Skog, K., Augustsson, K., Steineck, G., Stenberg, M., Jägerstad, M.:  
Food Chem. Toxicol., **35**, 555-565 (1997)
- [257] Skog, K., Jägerstad, M., Johansson, M.A.E.:  
Food Chem. Toxicol., **36**, 879 (1998)
- [258] Skog, K., Jägerstad, M., Laser Reuterswärd, A.  
Food Chem. Toxic., **30**, 681-688 (1992)
- [259] Skog, K., Jägerstad, M., Olsson, K.:  
in: The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology (Fi-  
not, Aeschbacher; Hrsg.), ISBN 3-7643-2354-X 0-8176-2354-X,  
Birkäuser-Verlag, Basel, 349-354 (1990)
- [260] Skog, K., Jägerstad, M., Olsson, K.:  
in: Risk Assessment of Cooked Food Mutagens, Reports from the Second Nordic  
Meeting, Var Föda (Busk, National Food Administration; Hrsg.),  
**42(2)**, Uppsala, 71-74 (1988)

- [261] Skog, K., Jägerstad, M.:  
Carcinogenesis, **14**, 2027-2031 (1993)
- [262] Skog, K., Jägerstad, M.:  
Carcinogenesis, **12**, 2297 (1991)
- [263] Skog, K., Jägerstad, M.:  
Mutation Res., **230**, 263-272 (1990)
- [264] Skog, K., Johansson, M.A.E, Jägerstad, M.:  
Food Chem. Toxicol., **36**, 879-896 (1998)
- [265] Skog, K., Solyakov, A., Arvidsson, P., Jägerstad, M.:  
J. Chromatogr. A, **803**, 227 (1998)
- [266] Skog, K., Solyakov, A.:  
Food Chem. Toxicol., **40**, 1213-1221 (2002)
- [267] Skog, K., Steineck, G., Augustsson, K., Jägerstad, M.:  
Carcinogenesis, **16**, 861-867 (1995)
- [268] Skog, K.:  
Food Chem. Toxicol., **31**, 655-675 (1993)
- [269] Skog, K.:  
Food Chem. Toxicol., **40** 1197-1203 (2002)
- [270] Skoog, D.A, Leary, J.J.:  
Instrumentelle Analytik: Grundlagen-Geräte-Anwendung, ISBN 3-540-60450-2,  
660-673 (1996)
- [271] Skoog, D.A, Leary, J.J.:  
Instrumentelle Analytik: Grundlagen-Geräte-Anwendung, ISBN 3-540-60450-2,  
675-681 (1996)
- [272] Smith, M.A.:  
J. Toxicol. Environ. Health, **50**, 567-579 (1997)
- [273] Stavric, B., Matula, T.I., Klassen, R., Downie, R.H.:  
Food Chem. Tox., **31**, 981-987 (1993)
- [274] Steinig, J., Montag, A.:  
Z. Lebnesm. Unters. Forsch., **174**, 453-457 (1982)
- [275] Stillwell, W.G., Kidd, L.R., Wishnok, J.S., Yu, M.C., Ross, R.K., Henderson, B.E.:  
in: Proceedings of the 44<sup>th</sup> ASMS conference on mass spectrometry and allied topics,  
Portland, Oregon, 207 (1996)
- [276] Sugimura, T., Kawashi, T., Nagao, M., Yahagi, T., Seino, Y., Oamoto, T., Shudo,  
K., Kosuge, T., Tsuji, K., Wakabayashi, K., Iitaka, Y., Itai, A.:  
Jpn. Acad., **53 B**, 58-61 (1977)
- [277] Sugimura, T., Nagao, Kawashi, T.,M, Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Sato, S.,  
Matatusukra, N., Matsushima, T., Shirai, A., Sawamura, M., Matumoto, H.:  
in: Origin of Human Cancer (Hiatt, H.; Hrsg.), ISBN 0-87969-119-0,  
Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1561-1577 (1977)
- [278] Sullivan, J.F.:  
Progr.Fd.Nutr.Sci., **5**, 377 (1981)

- [279] Sulser, H. (Hrsg.):  
Die Extraktstoffe des Fleisches, ISBN 3-8047-0560-X,  
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1978
- [280] Sulser, H., Büchi, W.:  
Lebensm. Wiss. Technol., **2**, 105-115 (1969)
- [281] Takahashi, M., Wakabayashi, K., Nagao, M., Yamamoto, M., Masui, T., Goto, T.,  
Kinae, N., Tomita, I., Sugimura, T.:  
Carcinogenesis, **6**, 1195-1199 (1985)
- [282] Takeoka, G.R., Coughlin, J.R., Rusell, G.F.:  
in: Symposium on the Analysis of Food and Beverages (Charalambous, G.; Hrsg.),  
Vol. 1, Academic Press, London, 179 (1979)
- [283] Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson S., Tornqvist, M.:  
J. Agric. Food Chem, **50**, 4998-5006
- [284] Taylor, R.T., Fultz, E., Knize, M.G., Felton, J.S.:  
Environmental Mutagenesis, **9(8)**, 106 (1987)
- [285] Taylor, R.T., Shore, V., Fultz, E.:  
Environ. Sci. Health, **A19**, 719-845 (1984)
- [286] Thenot, J.P., Horning, E.C.:  
Anal. Letters, **5**, 217 – 223 (1972)
- [287] Thiébaud, H.P., Knize, M.G., Kuzmicky, P.A., Felton, J.S., Hsieh, D.P.:  
J. Agric. Food Chem., **42**, 1502 (1994)
- [288] Thiébaud, H.P., Knize, M.G., Kuzmicky, P.A., Hsieh, D.P., Felton, J.S.:  
Food Chem. Toxicol., **33**, 821-828 (1995)
- [289] Thornalley, P.J.:  
General Pharmacol., **27**, 565-573 (1996)
- [290] Tikkanen, L.M., Latavkala, K.J., Heiniö, R.L.:  
Food Chem. Toxicol., **34**, 725 (1996)
- [291] Tikkanen, L.M., Sauri, T.M., Latva-Kala, K.J.:  
Food Chem. Toxicol., **31**, 717-721 (1993)
- [292] Toribio, F, Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T.:  
J. Chromatogr. A, **869**, 307-417 (2000)
- [293] Toribio, F, Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T.:  
J. Mass Spectrometry, **37**, 812-828 (2002)
- [294] Toribio, F., Galceran, M.T., Puignou, L.:  
J. Chromatogr. B, **747**, 171-202 (2000)
- [295] Trojano, E., Olano, A., Jimeno, M.L., Sanz, J., Martinez-Castro, I.:  
Dairy Res., **59**, 507-515 (1992)
- [296] Turesky, R., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., Pfund, R.A., Buchi, G.H.:  
Carcinogenesis, **4**, 863 (1983)
- [297] Turesky, R.J., Bur, H., Huynh-Ba, T., Aeschbacher, H.U., Milon, H.:  
Food Chem. Toxicol., **26**, 501-509 (1988)

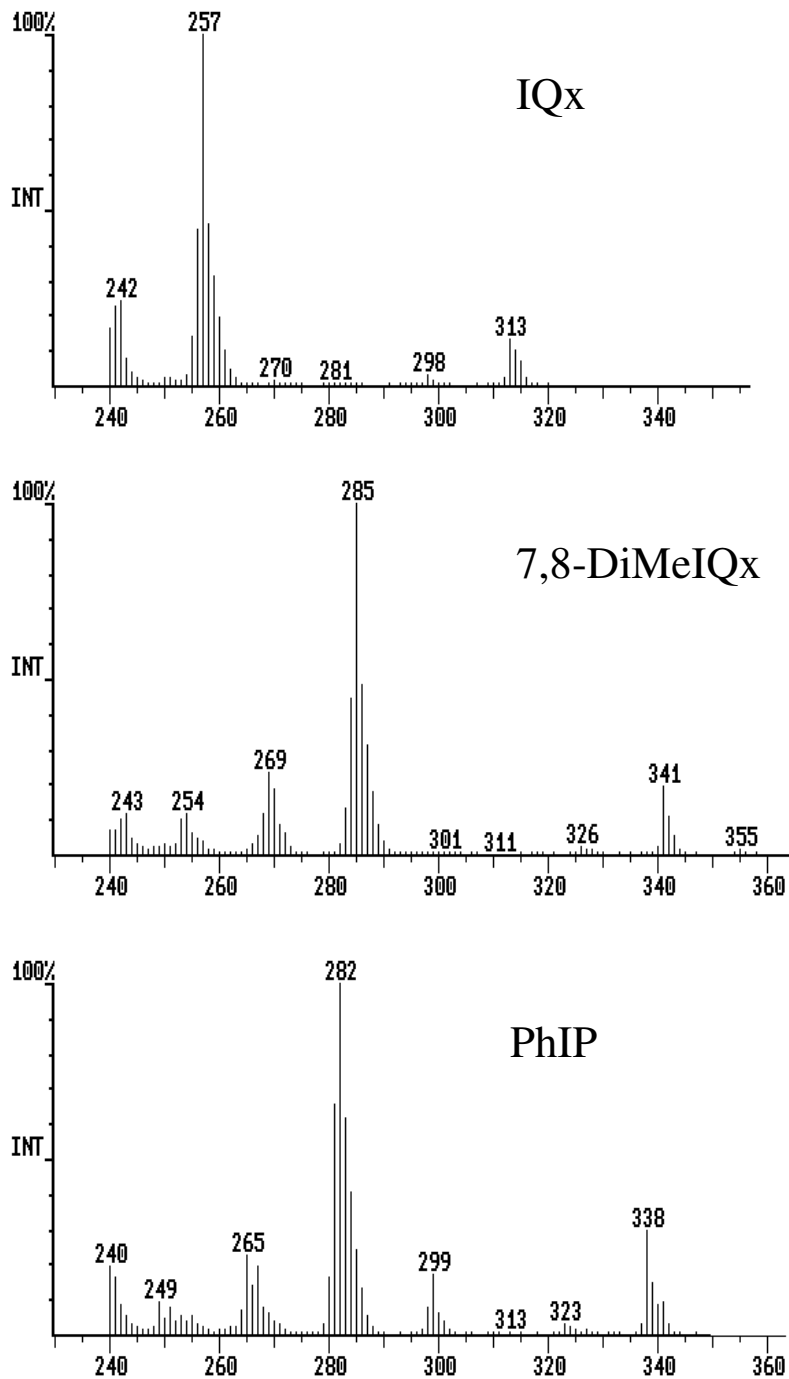
- [298] Turesky, R.J., Fay, L.B., Wethi, D.H.:  
in: Proceedings of the 23<sup>rd</sup> International Symposium of the Princess Takamatsu  
Cancer Research Fund, 59-68 (1995)
- [299] Turesky, R.J., Forster, C.M., Aeschbacher, H.U., Würzner, H.P., Skipper, P.L.,  
Trudel, L.J., Tannenbaum, S.R.:  
Carcinogenesis, **10**, 151-156 (1989)
- [300] Uhde, W.-J., Macholz, R.:  
Die Nahrung, **30(1)**, 59-73 (1986)
- [301] Umano, K., Shibamoto, K.:  
J. Agric. Food Chem., **35**, 909-912 (1987)
- [302] Uyeta, M., Kanada, T., Mazaki, M., Taue, S., Takahashi, S.:  
in: Naturally Occuring Carcinogen-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis  
(Miller, X., Miller, X., Hirono, X.; Hrsg), ISBN 0-256455-04255-3,  
University Park Press, Baltimore (Maryland), 169-176 (1979)
- [303] Vaintotalo, S., Matveinen, K., Reunanen, A.:  
Fresenius J. Anal. Chem., **345**, 462-466 (1993)
- [304] Van de Ouweland, G.A.M., Peer, H.G.:  
Rec. Trav. Chim., **89**, 750-762 (1970)
- [305] Vanderlaan, M., Watkins, B.E., Hwan, M., Knize, M.G., Felton, J.S.:  
Carcinogenesis, **10**, 2215 (1989)
- [306] Vanderlaan, M., Watkins, B.E., Hwan, M., Knize, M.G., Felton, J.S.:  
Carcinogenesis, **9**, 153 (1988)
- [307] Vollenbröker, M.:  
Untersuchung der Bildung von Heterocyclischen Aromatischen Aminen in  
Modellsystemen, Lebensmitteln und Reaktionsaromen,  
Dissertation WWU Münster, 2000
- [308] Wakabayashi, K., Ushiyama, H., Takahashi, M., Nukaya, H., Kim, S.-B., Hirose, M.,  
Ochiai, M., Sugimura, T., Nagao, M.:  
Environ. Health Perspect., **99**, 129-133 (1993)
- [309] Wakabayshi, K., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka,  
Y., Yagahi, T., Nagao, M., Sugimura, T.:  
Jpn. Acad., **54 B**, 569-571 (1979)
- [310] Wang, P.S., Odell, G.V.:  
J. Agric. Food Chem., **21**, 868-870 (1973)
- [311] Weenen, H.:  
Food Chem., **62**, 393-401 (1998)
- [312] Westphal, G., Kroh, L.,  
Die Nahrung, **29**, 765-775 (1985)
- [313] Wittmann, R., Eichner, K.:  
Z. Lebensm. Unters. Forsch., **188**, 212-220 (1989)
- [314] Wittmann, R.:  
Bildung und Nachweis von Amadori- und Heyns-Umlagerungsprodukten,  
Dissertation WWU-Münster, 1986



- [315] World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a global Perspective, ISBN 1-899533-05-2, Washington DC, 1997
- [316] Wu, J., Wong, M.K., Lee, H.K., Ong, C.N.:  
*J. Chromatogr. Sci.*, **33**, 712-716 (1995)
- [317] Wu, J., Wong, M.K., Li, S.F.Y., Lee, H.K., Ong, C.N.:  
*J. Chromatogr. A*, **709**, 351-359 (1995)
- [318] Wu, J., Wong, M.K., Li, S.F.Y., Lee, H.K., Ong, C.N.:  
*J. Chromatogr. Sci.*, **34**, 139-145 (1996)
- [319] Xenakis, D., Moll, N., Gross, B.:  
*Synthesis*, **7**, 541-543 (1983)
- [320] Yamaguchi, K., Shudo, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M., Sugimura, T.:  
*Gann.*, **71**, 743-744 (1980)
- [321] Yamaizumi, Z., Kasai, H., Nishimura, S., Edmonds, C.G., McCloskey, J.A.:  
*Mut. Res.*, **173**, 1-7 (1986)
- [322] Yamaizumi, Z., Shiomi, T., Kasai, H., Nishimura, S., Takahashi, Y., Nagao, M., Sugimura, T.:  
*Cancer Lett.*, **9**, 75-83 (1980)
- [323] Yamamoto, K., Noguchi, M.:  
*Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2185 (1973)
- [324] Yamamoto, T., Tsuji, K., Kosuge, T., Okamoto, T., Shudo, K., Takeda, K., Iitaka, Y., Yamaguchi, K., Seino, Y., Yagahi, T., Nagao, M., Sugimura, T.:  
*Proc. Jpn. Acad.*, **54**, 248-250 (1978)
- [325] Yang, C.C., Jenq, S.N., Lee, H.:  
*Carcinogenesis*, **194**, 359-363 (1998)
- [326] Yaylayan V.A., Huyghues-Despointes, A.:  
*Critical reviews in Food Science and Nutrition*, **34(4)**, 321-369 (1994)
- [327] Yaylayan, V., Wnorowski, A., Perez Locas, C.:  
*J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1753-1757 (2003)
- [328] Yen, G.C., Chau, C.F.:  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57**, 664-665 (1993)
- [329] Yokota, M., Narita, K., Kosuge, T., Wakabayashi, K., Nagao, M., Sugimura, T., Yamaguchi, K.:  
*Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 1473-1475 (1981)
- [330] Yoshida, D., Matsomoto, T., Yoshimura, R., Matsuzaki, T.:  
*Biophys. Res. Commun.*, **83**, 915-920 (1978)
- [331] Yoshida, D., Saito, Y., Mitsuzaki, S.:  
*Agric. Biol. Chem.*, **48**, 241-243 (1984)
- [332] Zhao, Y., Schelfaut, M., Sandra, P., Banks, F.:  
*Electrophoresis*, **19**, 2213 (1998)
- [333] Zürchner, K., Hardorn, H.:  
*Dtsch.. Lebensm. Rundsch.*, **70**, 425-431 (1974)

## 8 Anhang

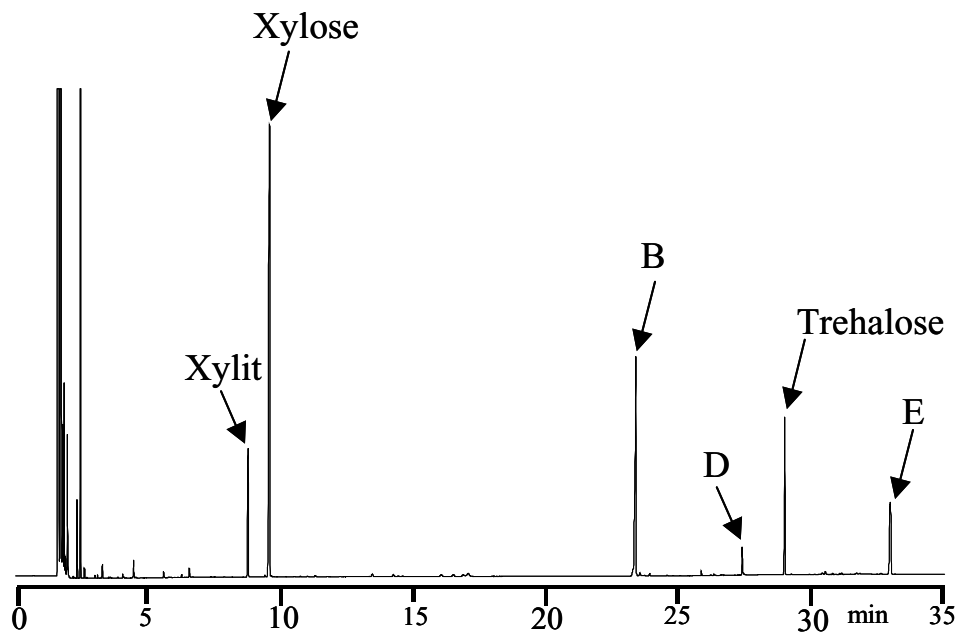
### 8.1 GC-ITD-Massenspektren (EI) von TBDMS-Ethern der HAAs



**Abbildung 8.1**

Massenspektrum von mit MTBSTFA silyliertem IQx (oben), 7,8-DiMeIQx (Mitte) und PhIP (unten) (vgl. 6.9.6),  $[M]^+$ =313, 341 bzw. 338; GC-Trennung: siehe Abb. 2.38, ITD-Detektion: Multiplier 2200; B-Sensitivity 5000, weitere Parameter siehe Kapitel 6.8.4.1

## 8.2 GC-FID-Chromatogramme einer Probe eines Xylose, Alanin und OPD enthaltenden, methanolischen Reaktionsansatzes

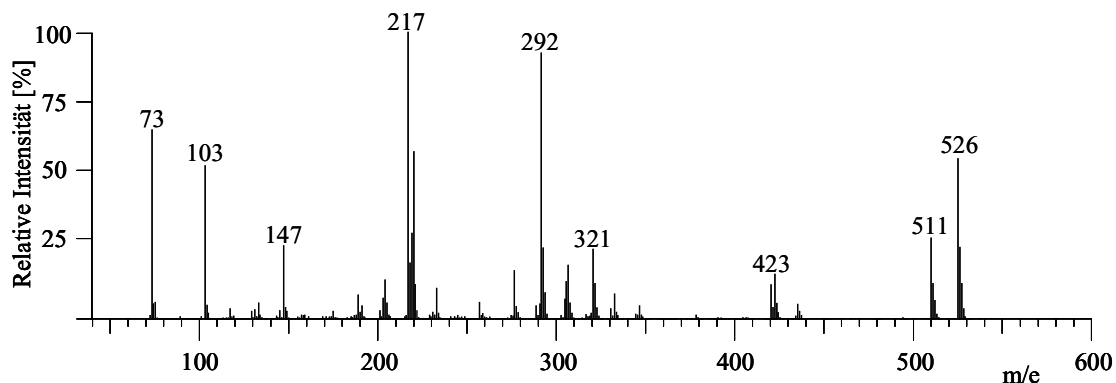


**Abbildung 8.2**

Analytische GC-FID-Trennung nach Oximierung und Silylierung (vgl. 6.8.3.2) einer aus einem Reaktionsansatz (130 mmol Xylose, 65 mmol L-Alanin und 50 mmol OPD in 50 ml Methanol, abs.) entnommenen Probe (nach 59 min reflux, Lösungsmittel im Gasstrom entfernt)

## 8.3 Massenspektren nachweisbarer Verbindungen von in Xylose, Alanin, Natriumdisulfit und OPD enthaltenden methanolischen Reaktionsansatzes

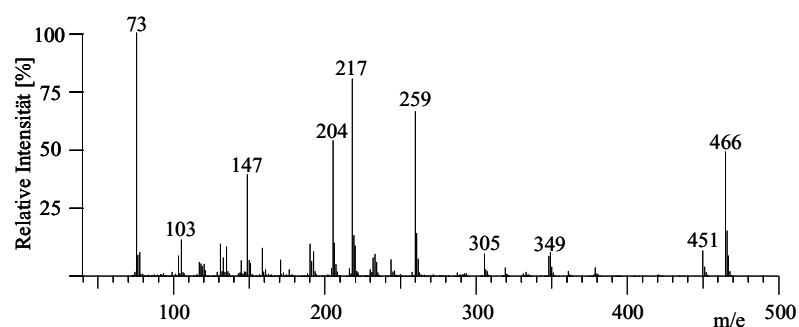
### 8.3.1 Verbindung B, SCHIFF'sche Base von 2-Xylosulose und OPD, $m/e = 526$



**Abbildung 8.3**

Massenspektrum der nach 6.8.5.3 silylierter und gaschromatographisch getrennten SCHIFF'schen Base von Xylose und OPD (Verbindung B,  $[M]^+$ : 526), GC-Trennung vgl. Abb. 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1.

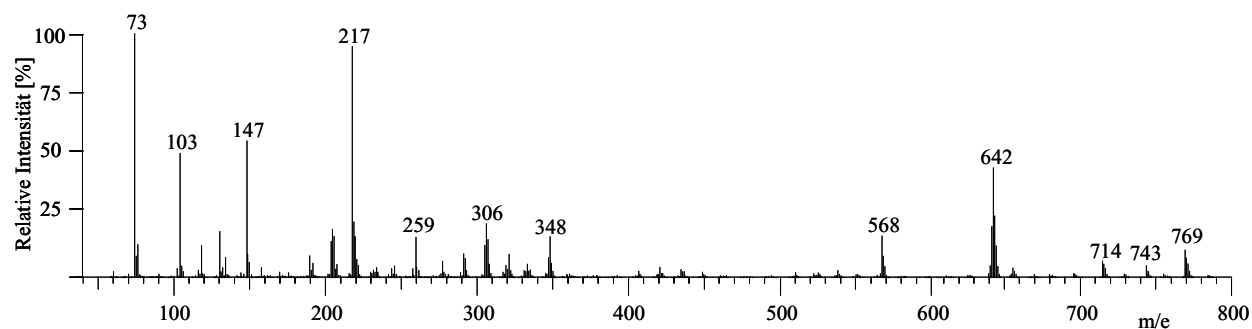
### 8.3.2 Verbindung D, $m/e = 466$



**Abbildung 8.4**

Massenspektrum der Verbindung D ( $[M]^+$ : 466), nach 6.8.5.3 aufgearbeitet und silyliert, GC-Trennung vgl. Abbildung 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1.

### 8.3.3 Verbindung E, $m/e = 769$



**Abbildung 8.5**

Massenspektrum der Verbindung E ( $[M]^+ > 800$ ), nach 6.8.5.3 aufgearbeitet und silyliert, GC-Trennung vgl. Abbildung 3.25, MS-Parameter unter Kapitel 6.8.5.1 (gerätebedingte höchste SCAN-Masse:  $m/e = 800$ ).

## 8.4 Xyl-Ala / 1-Desoxy-1-alanyl-xylulose

### 8.4.1 Massenspektrum von direkt in Reaktionsansätzen nachweisbaren Xyl-Ala (einfach-silyliert)

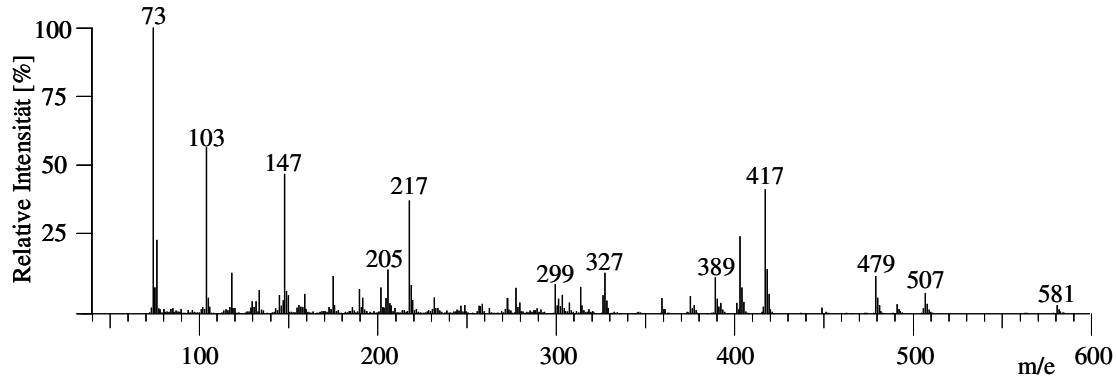
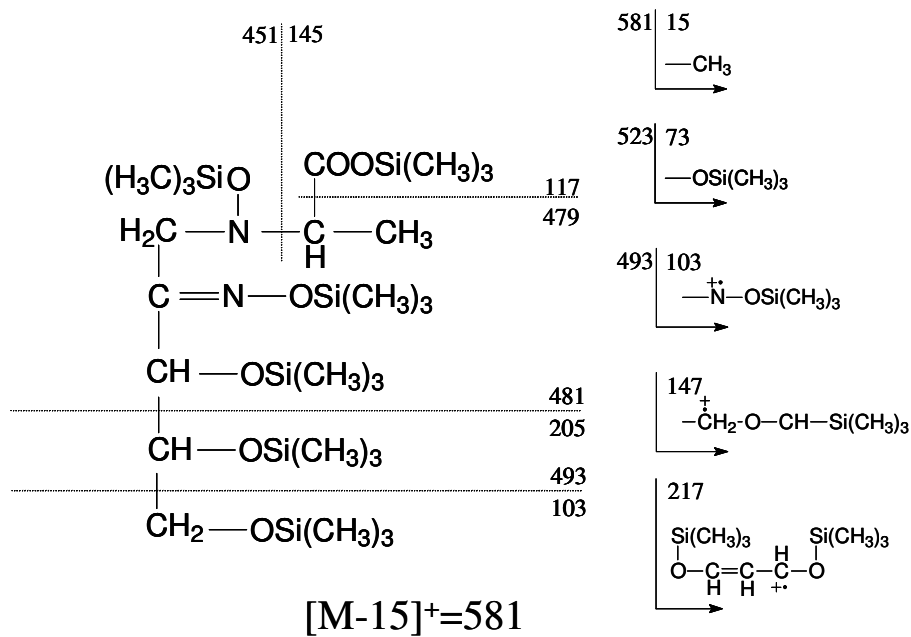


Abbildung 8.6

Massenspektrum von derivatisiertem Xylulose-Alanin (1-Desoxy-1-alanyl-xylulose), aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid, Silylierung mit MSTFA-TMCS

### 8.4.2 Fragmentierungsschema von Xyl-Ala (einfach-silyliert)



### 8.4.3 Massenspektrum von direkt in Reaktionsansätzen nachweisbarem Xyl-Ala (doppelt-silyliert)

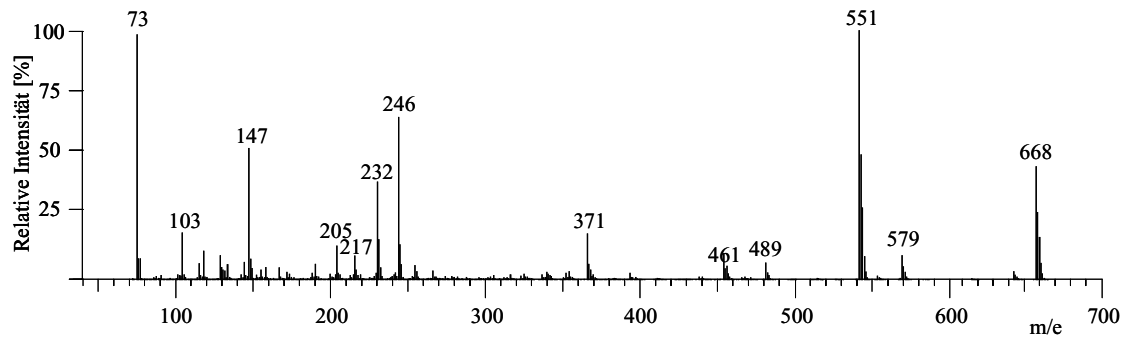
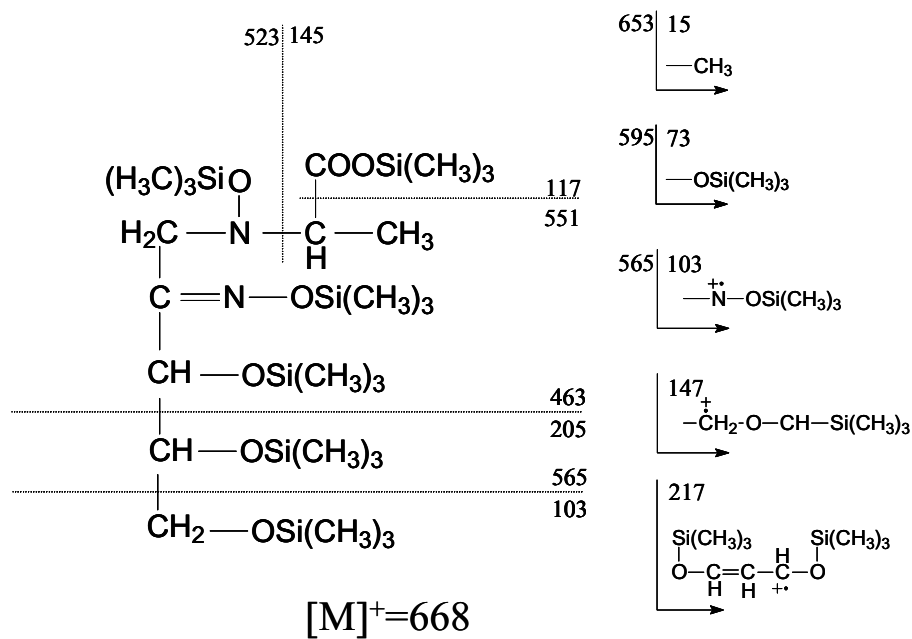


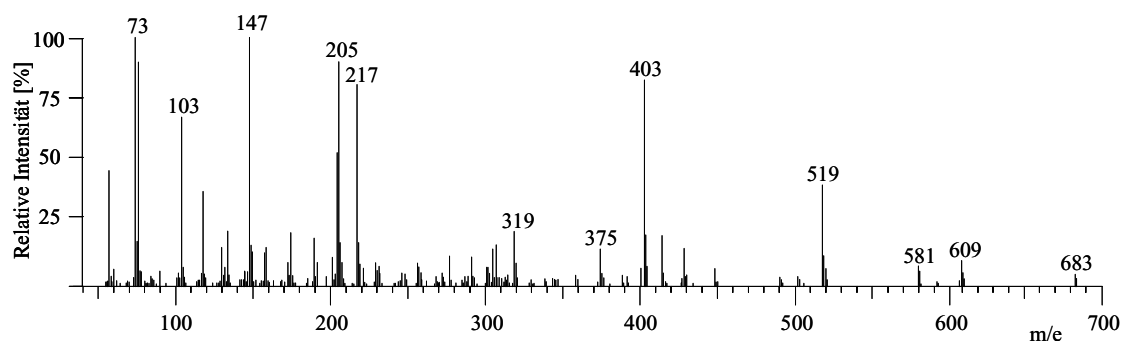
Abbildung 8.7

Massenspektrum von derivatisiertem Xylulose-Alanin (1-Desoxy-1-alanyl-xylulose), aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70 eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid, Silylierung mit MSTFA-TMCS

### 8.4.4 Fragmentierungsschema von Xyl-Ala (doppelt silyliert)



## 8.5 Fru-Ala / 1-Desoxy-1-alanyl-fructose

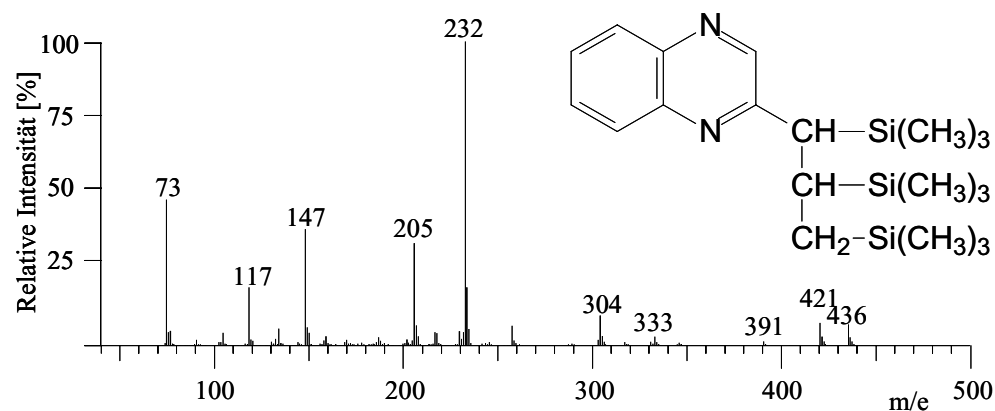


**Abbildung 8.8**

Massenspektrum von derivatisiertem Fructose-Alanin (1-Desoxy-1-alanyl-fructose), aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid, Silylierung mit MSTFA-TMCS,  $[M-15]^+$ : 683

## 8.6 Massenspektren von unterschiedlich derivatisierter 2-Xylosulose aus präparativen Reaktionsansätzen

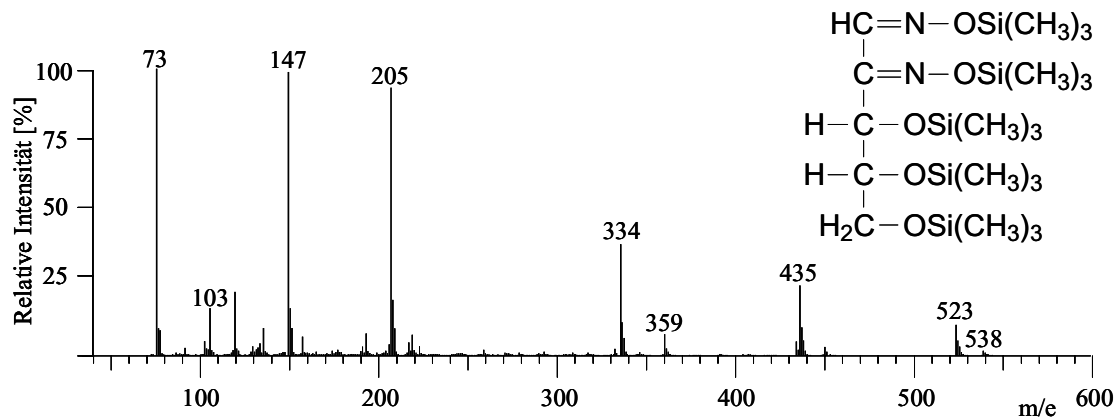
### 8.6.1 Silyliertes Chinoxalinderivat der 2-Xylosulose



**Abbildung 8.9**

Massenspektrum des silylierten Chinoxalinderivates der 2-Xylosulose; aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70 eV, Scan 50-700 u); Silylierung mit MSTFA-TMCS,  $[M]^+$ : 436

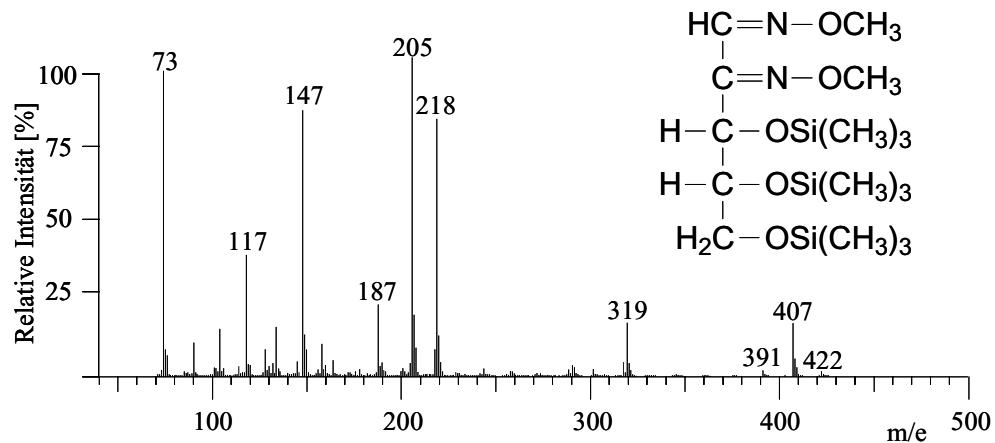
### 8.6.2 Oximierte und silylierte 2-Xylosulose (Hydroxylammoniumchlorid + MSTFA)



**Abbildung 8.10**

Massenspektrum von oximierter und silylierter 2-Xylosulose; aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70 eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit Hydroxylammoniumchlorid in Pyridin, Silylierung mit MSTFA-TMCS,  $[\text{M}]^+$ : 538

### 8.6.3 Oximierte und silylierte 2-Xylosulose (O-Methyl-hydroxylammoniumchlorid + MSTFA)



**Abbildung 8.11**

Massenspektrum von oximierter und silylierter 2-Xylosulose; aufgenommen mit GC-Quadrupol-MS (EI, 70 eV, Scan 50-700 u); Oximierung mit O-Methyl-hydroxylammoniumchlorid in Pyridin, Silylierung mit MSTFA-TMCS,  $[\text{M}]^+$ : 422



## 8.7 Physikalische und chemische Daten für das Chinoxalin der 2-Xylosulose nach Morita et al.

Morita et al. [Lit. 191] konnten das Chinoxalin des 3-Desoxyosons der Xylose erstmals in Form des acetylierten Derivates, an dem auch eine eingehende Strukturaufklärung durchgeführt wurde, nachweisen.

Später erfolgte eine Charakterisierung der Reinsubstanz:

$m_p$  120 °C

$[\alpha]^{25}$  (589 nm) = -121 °C (c 0,4, MeOH)

UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 237, 317 nm

$\nu_{max}$  (KBr,  $cm^{-1}$ ): 760, 1050, 1150, 1330, 1370, 1460, 1480, 2850, 3230

## 8.8 Strukturabsicherung durch $^1H$ -Kernresonanzspektroskopie

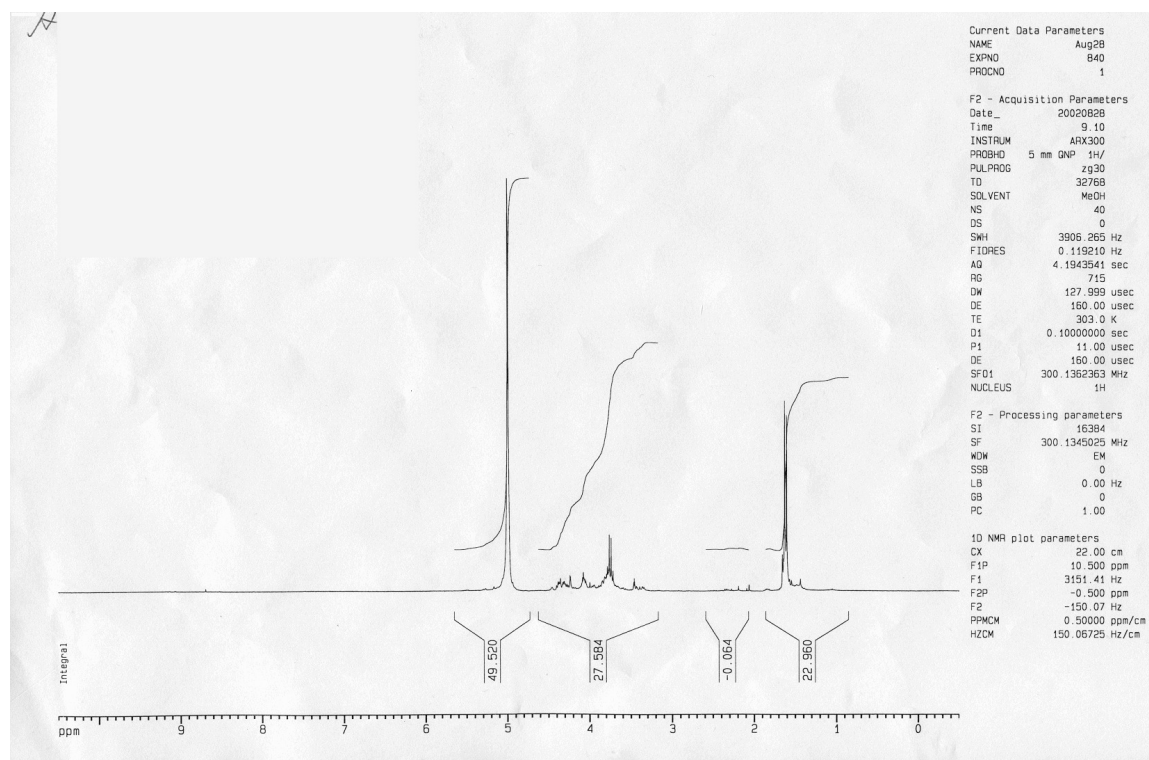
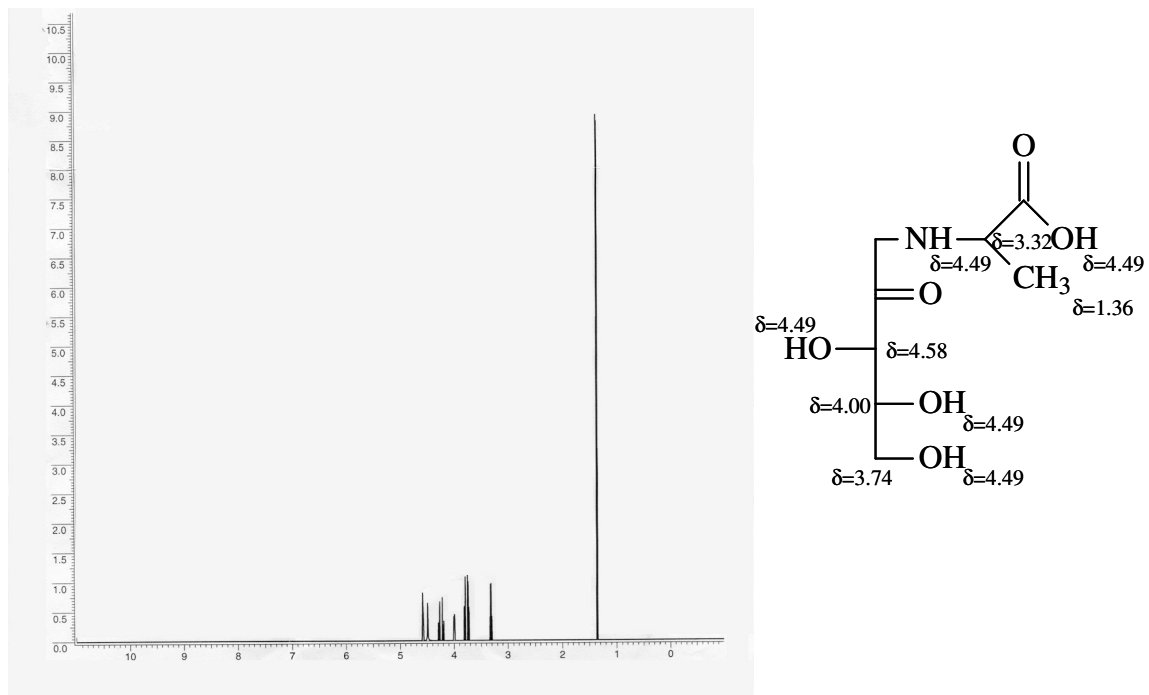


Abbildung 8.12

$^1H$ -NMR-Spektrum (360 MHz) der präparativ dargestellten 1-Desoxy-1-alanyl-xylosulose in deuteriertem Methanol

**Abbildung 8.13**

berechnetes  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 1-Desoxy-1-alanyl-xylosulose (ACD/HNMR-Predictor (Vers. 5.12))

## 8.9 Überblick über die in den eigenen Arbeiten untersuchten

### Avicel-Modellsystemen mit Zusatz von OPD als Trapping-Reagenz

Zucker-komponente (ZK)	Aminosäure	Kreatinin	Überschuß an Abfangreagenz bezogen auf ZK	M olmengen-verhältnis	Art des Modellsystems/ Lagerung (für 7d)	Probenahme, ggf. nach Erhitzung	Extraktionsvarianten
Glucose	-	-	5-fach OPD	1:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Glucose	Glycin	-	5-fach OPD	1:2:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Glucose	Glycin	Kreatinin	5-fach OPD	1:2:2:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Xylose	-	-	5-fach OPD	1:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol, Butanol
Xylose	Glycin	-	5-fach OPD	1:2:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol, Butanol
Xylose	Glycin	Kreatinin	5-fach OPD	1:2:2:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52,,	RT	Wasser, Methanol, Butanol
Xylose	Glycin	Kreatinin	0,1-fach OPD	1:2:2:0,1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Xylose	Glycin	Kreatinin	0,5-fach OPD	1:2:2:0,5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Xylose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1,0	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Xylose	Glycin	Kreatinin	2,5-fach OPD	1:2:2:2,5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser, Methanol
Xylose	-	-	1-fach OPD	1:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT, von 70 °C (Start) kontinuierlich mit 0,75 °C/min; alle 15 min Probenahme bis 140 °C	Wasser
Xylose	-	-	1-fach OPD	1:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Glycin	-	1-fach OPD	1:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	Einzelproben bei 70, RT, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52,,	Einzelproben bei 70, RT, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Glucose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	Einzelproben bei 70, RT, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser

Zucker-komponente (ZK)	Aminosäure	Kreatinin	Überschuß an Abfangreagenz bezogen auf ZK	M olmengen-verhältnis	Art des Modellsystems/ Lagerung (für 7d)	Probenahme, ggf. nach Erhitzung	Extraktionsvarianten
Xylose	Alanin	-	1-fach OPD	1:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Alanin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	Einzelproben bei 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Glycin	Kreatinin	1-fach 1,8-Diaminonaphthalin	1:2:2:1	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser
-	Glycin	Kreatinin	2,5-fach, aber bezogen auf Glycin	2:2:5	Avicel, a <sub>w</sub> =0,52	RT	Wasser

Zucker- komponente (ZK)	Aminosäure	Kreatinin	Überschuß an Abfangreagenz bezogen auf ZK	Molmengen- verhältnis	Art des Modellsystems/ Lagerung (für 7d)	Probenahme, ggf. nach Erhitzung	Extraktions- varianten
Xylose	-	-	1-fach OPD	1:1	Avicel, jeweils $a_w=0,44$ und $a_w=0,75$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Glycin	-	1-fach OPD	1:2:1	Avicel, jeweils $a_w=0,44$ und $a_w=0,75$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Xylose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, jeweils $a_w=0,44$ und $a_w=0,75$	Einzelproben bei 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Ribose	Glycin	-	1-fach OPD	1:2:1	Avicel, $a_w=0,52$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Ribose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, $a_w=0,52$ ..	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Ribose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, $a_w=0,52$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Arabinose	Glycin	-	1-fach OPD	1:2:1	Avicel, $a_w=0,52$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Arabinose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, $a_w=0,52$ ..	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser
Arabinose	Glycin	Kreatinin	1-fach OPD	1:2:2:1	Avicel, $a_w=0,52$	Einzelproben bei RT, 70, 80, 90, 105, 125, 140 °C für 30 min	Wasser

## 9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIA	Aminoimidazoazaarene
Ala	L-Alanin
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
Ara	L-Arabinose
ATP	Adenosintriphosphat
$a_w$	Gleichgewichtsfeuchtigkeit
A $\alpha$ C	2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i> ]indol (Amino- $\alpha$ -Carbolin)
CE	Kapillarelektrophorese
CI	Chemische Ionisation
CID	Collision Induced Dissociation
Cre-P-1	4-Amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1 <i>H</i> ,6 <i>H</i> -pyrrolo[3,4- <i>f</i> ]-benzimidazol-5,6-dion
DAD	Diodenarray Detektor
DEG	Diethylenglycol
DMIP	2-Amino- <i>n,n</i> -dimethylimidazopyridin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ELCD	Elektrochemische Detektorm
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
ESI	Elektrospray-Ionisation
Fru	Fruktose
GC	Gaschromatographie
GC-ECD	Gaschromatographie mit Detektion mittels Elektroneneinfangdetektor
GC-FID	Gaschromatographie mit Detektion mittels Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrischer Detektion
Glc	Glukose
Glc-P-1	2-Amino-6-methyldipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol
Glc-P-2	2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3',2'- <i>d</i> ]imidazol
Gly	L-Glycin
HAA	heterocyclische aromatische Amine
HMF	Hydroxymethylfurfural

---

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
IQx	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinoxalin
ITD	Ionenfallenmassenspektrometer
Leu	L-Leucin
Lys	L-Lysin
Lys-P-1	3,4-Cyclopentenpyrido[3,2-a]carbazol
MeA $\alpha$ C	2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3-b]indol (Methylamino- $\alpha$ -Carbolin)
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4-MeIQx	2-Amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
7,8-DiMeIQx	2-Amino-3,7,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,7,8-TriMeIQx	2-Amino-3,4,7,8-tetramethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
4,8-DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
MRP	Maillard-Reaktionsprodukt
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid
MTBSTFA	N-(tert.-butyldimethylsilyl)-N-methylfluoracetamid
NCI	negative chemische Ionisation
NMR	Kernresonanzspektroskopie
OPD	ortho-Phenylendiamin
Orn-P-1	4-Amino-6-methyl-1 <i>H</i> -2,5,10,10 <i>b</i> -tetraazofluoranthen
PCI	positive chemische Ionisation
Phe	L-Phenylalanin
Phe-P-1	2-Amino-5-phenylpyridin
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
4'-OH-PhIP	2-Amino-1-methyl-6[4-hydroxyphenyl]imidazo[4,5-b]pyridin
Pro	L-Prolin
Rib	Ribose
SCAN	Detektion über einen kontinuierlichen Massenbereich
SCX	Stark saures Kationenaustauschermaterial
Ser	L-Serin
SEV	Sekundärelektronenvervielfacher
SIM	Selected Ion Monitoring

---

SPE	Solid Phase Extraction
SRM	Selected Reaction Monitoring
TBDMCS	tert.-Butyldimethylchlorsilan
TBDMS	tert.-Butyldimethylsilyl-(Gruppe)
TEAP	Triethylammoniumphosphat
TFBB	3,5-Bis(trifluormethyl)benzylbromid
Thr	L-Threonin
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMIP	2-Amino-n,n,n-trimethylimidazopyridin
TMS	Trimethylsilyl-(Gruppe)
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]indol
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i> ]indol
Tyr	L-Tyrosin
UV	Ultraviolett(es) (Licht)

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf dem 32. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2003 in München im Rahmen von Posterbeiträgen (LM-PST-042\* u. LM-PST-043\*\*) präsentiert. Anschließend wurden die Inhalte des Posters im Rahmen von Kurzbeiträgen veröffentlicht (Lebensmittelchemie, **57**, 159 (2003)\* und Lebensmittelchemie, **57**, 159-160 (2003)\*\*).

---

\* C. Goldbeck, T. Bernsmann, O. Frandrup-Kuhr, K. Eichner:

Bildung von heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) in trockenen Systemen

\*\* O. Frandrup-Kuhr, K. Eichner, C. Goldbeck:

Schnelle Bestimmung von heterocyclischen aromatischen Aminen (HAAs) aus komplexen Matrices als tert.-Butylsilylderivate mit GC/MS



## Lebenslauf

**Name:** Oliver Frandrup-Kuhr, geb. Frandrup  
geboren am 6. Juni 1976 in Münster (Westf.)

**Familienstand:** verheiratet seit dem 27. September 2002 mit Claudia Kuhr

**Eltern:** Heinrich Frandrup  
Maria Frandrup, geb. Voß

**Schulbildung:** 1982 – 1986 Gemeinschaftsgrundschule Bösensell  
1986 – 1988 Geschwister-Scholl-Realschule Senden  
1988 – 1995 Clemens-Brentano-Gymnasium Dülmen

**Hochschulreife:** 24. Juni 1995 in Dülmen

**Studium:** WS 1995/96 bis SS 1999  
Studium der Lebensmittelchemie  
an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster  
WS 1995/96 bis SS 1999  
Studium der Diplom-Chemie  
an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

**Praktisches Jahr:** Dezember 1999 – Februar 2000  
Mitarbeit in der Lebensmittelrechtsabteilung TK/Frische  
Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG, Bielefeld  
März 2000 – April 2000  
Praktikum im Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt  
des Kreises Minden-Lübbecke, Minden  
Mai 2000 – November 2000  
Ausbildung in den Chemischen Untersuchungsämtern  
der Städte Hamm und Hagen

**Prüfungen:** 22. Oktober 1997  
Diplom-Chemiker-Vorprüfung  
15. Januar 1998  
Zwischenprüfung für Lebensmittelchemiker  
2. November 1999  
Erste staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker  
17. Januar 2001  
Zweite staatliche Prüfung für Lebensmittelchemiker

**Tätigkeiten:** 1. Januar 2001 – 31. Dezember 2003 Wissenschaftliche Hilfskraft am  
Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen Wilhelms-Universität  
Münster  
1. Januar 2003 – 31. Dezember 2003 Dozent an der Schule für  
Gesundheitsberufe der St. Franziskus-Hospital GmbH, Münster  
Seit dem 1. Januar 2004 lebensmittelchemischer Referent am Bundesamt  
für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dienststelle Bonn

**Beginn der Dissertation:** 1. Januar 2001 am Institut für Lebensmittelchemie der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster bei Herrn Prof. Dr. K. Eichner