

**Synthese, Charakterisierung und Nachweis neuartiger
Pyridinium-Proteinmodifikationen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II

Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Diplom-Lebensmittelchemiker Robert Johannes Rau

erster Gutachter: Prof. Dr. Marcus A. Glomb

zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Henle

Datum der Einreichung: 11.12.2023

Verteidigungsdatum: 29.05.2024

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb für die Möglichkeit, dieses anspruchsvolle und zugleich interessante Thema zu bearbeiten. Vielen Dank auch für das stets entgegengebrachte Vertrauen, die vielen fachlichen Diskussionen und Überlegungen zu den erhaltenen Ergebnissen. Herrn Prof. Dr. Henle danke ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. D. Ströhl und dem NMR-Team für die Anfertigung der zahlreichen NMR-Spektren sowie Herrn Dr. Andrej Frolov und Frau Dr. Annegret Laub für die Durchführung der HR-MS Messungen. Dem Arbeitskreis von Prof. Csuk und von Prof. Merzweiler danke ich für die Bereitstellung von trockenem Lösungsmittel und flüssigem Stickstoff.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt dem Arbeitskreis von Prof. Glomb für die hervorragende Arbeitsatmosphäre, die vielen fachlichen Diskussionen und die stetige Hilfsbereitschaft. Mein Dank gilt hier insbesondere Thomas, nicht nur für den wissenschaftlichen Austausch, sondern auch für die persönlichen Gespräche und die unzähligen Kaffeerunden. Einen Dank auch an Christian, der so manches kaputte Gerät wieder zum Laufen gebracht hat. Christoph danke ich für die musikalische Unterhaltung in der 428 und für den ein oder anderen Biergartenbesuch nach der Arbeit. Zudem danke ich Doreen für vier Jahre gute Tischnachbarschaft. Allen ehemaligen und gegenwärtigen Doktoranden danke ich für ein kollegiales Miteinander, insbesondere meinem sehr guten Freund Nils, der sowohl im Labor als auch außerhalb für den ein oder anderen Spaß zu haben war.

Zudem möchte ich meinen Diplomanden Michel, Niklas und Luca danken, denn ohne eure tatkräftige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt außerhalb des Labors. Der größte Dank geht an meine Freundin Viktoria, die ich in dieser Zeit kennenlernen durfte und mich von Anfang an unterstützt hat.

Vorwort

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Arbeitskreis für Lebensmittelchemie von Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Zeitraum von Juli 2018 bis Juni 2022 durchgeführt. Die vorliegende Arbeit wurde in monographischer Form angefertigt und die Forschungsergebnisse in einer internationalen Fachzeitschrift veröffentlicht.

Publikationsliste, Vorträge und Posterbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.

Publikationen:

Rau, R., Glomb, M. A.,
Novel Pyridinium Cross-Link Structures Derived from Glycolaldehyde and Glyoxal
J. Agric. Food Chem. **2022**, *70*, 4434–4444

Tagungsvorträge:

Rau, R., Glomb, M. A.,
Advanced Glycation Endproducts mit Pyridinium-Struktur in Lebensmitteln.
32. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen
Gesellschaft der GDCh, 24.-25.03.2022, Halle

Rau, R., Glomb, M. A.,
Isolierung und Charakterisierung neuartiger Pyridinium-Aminosäurederivate.
30. Arbeitstagung des Regionalverbandes Süd-Ost der Lebensmittelchemischen
Gesellschaft der GDCh, 26.-27.03.2020, Halle

Posterbeiträge:

Rau, R., Glomb, M. A.,
Nachweis neuartiger Maillard-Pyridinium-Proteinmodifikationen in Lysin-Carbonyl-Modell-
reaktionen und in Lebensmitteln.
49. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 30.08.-01.09.2021, Dresden
Abstract in Lebensmittelchemie, **2021**, *75*, 2

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Aktueller Stand der Forschung	2
2.1	Die Maillard-Reaktion	2
2.1.1	Anfangsphase	2
2.1.2	Entstehung reaktiver Intermediate.....	3
2.1.3	Bildung von Advanced Glycation Endproducts	7
2.2	Pyridinium-Proteinmodifikationen	10
2.2.1	Strukturen und Bildungswege	10
2.2.2	Pyridinium-AGEs als Photosensibilisatoren	13
2.3	Proteinmodifizierung im Lebensmittel	15
2.3.1	Frittiervorgang und Kartoffelchips.....	18
2.3.2	Veränderungen und Folgeprodukte während des Frittierens.....	20
3	Zielstellung	24
4	Ergebnisse und Diskussion	25
4.1	Synthese verschiedener Pyridinium-AGEs	25
4.1.1	Darstellung von <i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc)Amino]-6-iodhexansäure	26
4.1.2	Darstellung von mono- und bivalenten Pyridinium-AGEs	28
4.1.3	Strukturanalyse.....	30
4.1.4	Stabilität.....	35
4.1.5	Entwicklung einer MRM-Methode	36
4.2	Modelluntersuchungen zur Bildung von Pyridinium-AGEs.....	38
4.2.1	Kurzkettige Carbonylverbindungen	38
4.2.2	Höherkettige Zucker.....	42
4.3	Photoinduzierte Bildung von ¹ O ₂ durch Pyridinium-AGEs.....	45
4.4	Bildung von Pyridinium-AGEs in prozessierten Lebensmitteln.....	49
4.4.1	Untersuchung von kommerziellen Kartoffelchips.....	49
4.4.2	Synthese von <i>N</i> ⁶ -(2,3-Dihydroxypropyl)-Lysin	59
4.4.3	Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Frittierens	60
4.4.4	Bildung von AGEs in Rindfleischbratlingen.....	63
4.4.5	Quantifizierung von Ribose in Fleisch	64
4.4.6	Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Grillens.....	65
5	Zusammenfassung	68
6	Experimenteller Teil	71

6.1	Synthesen	71
6.1.1	Darstellung von N^{α} -Boc- N^{ϵ} -Cbz-Lysin- <i>tert</i> -butylester	71
6.1.2	Darstellung von N^{α} -Boc-Lysin- <i>tert</i> -butylester	71
6.1.3	Darstellung von <i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc) Amino]-6-hydroxyhexansäure	71
6.1.4	Darstellung von <i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc) Amino]-6-iodhexansäure	72
6.1.5	Darstellung von 3-(Boc-Amino)-Pyridin	72
6.1.6	Darstellung von 4-(Boc-Amino)-Pyridin	72
6.1.7	Darstellung von 3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridin	73
6.1.8	Darstellung von 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridin	73
6.1.9	Darstellung von <i>meta</i> -DLP	73
6.1.10	Darstellung von <i>para</i> -DLP	74
6.1.11	Darstellung von OP-Lysin	74
6.1.12	Darstellung von GLAP	75
6.1.13	Darstellung von HOP-Lysin	75
6.1.14	Darstellung von NDPO ₂	75
6.1.15	Darstellung von N^{ϵ} -(2,3-Dihydroxypropyl)-Lysin	76
6.2	Modellinkubationen unter aeroben Bedingungen	76
6.2.1	Inkubationen von kurzkettigen Carbonylen mit N^{α} - <i>tert</i> -Boc-Lysin	76
6.2.2	Inkubationen von Zuckern mit N^{α} - <i>tert</i> -Boc-Lysin	76
6.3	Modellinkubationen unter anaeroben Bedingungen	77
6.3.1	Inkubationen mit 1- ¹³ C-markierten Glycolaldehyd	77
6.4	Bestrahlungsmodellexperiment	77
6.5	Aufarbeitung von Kartoffelchips	78
6.5.1	Proteinisolierung kommerzieller Kartoffelchips	78
6.5.2	Frittieren von Kartoffelscheiben	78
6.6	Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl	79
6.7	Proteinhydrolyse	79
6.7.1	Saure Proteinhydrolyse	79
6.7.2	Enzymatische Proteinhydrolyse	80
6.8	Quantifizierung von AGEs mittels LC-MS/MS	80
6.9	Anreicherung und CID-Spektren der Pyridinium-AGEs	80
6.10	Aufarbeitung von Rindfleischbratlingen	81
6.10.1	Herstellung der Bratlinge	81
6.10.2	Quantifizierung von D-Ribose	81
6.10.3	Zugabe von reduzierenden Zuckern	82
7	Puffer und Lösungen	83

7.1	Phosphatgepufferte Salzlösung (10 mM, 1 mM NaCl, pH 7,4).....	83
7.2	Phosphatpuffer (aerob, 0,2 M, pH 7,4)	83
7.3	Phosphatpuffer (anaerob, 0,2 M, pH 7,4).....	83
7.4	OPA-Derivatisierungsreagenz.....	83
8	Chemikalien und Geräte	84
8.1	Chemikalien	84
8.2	Geräte.....	85
8.2.1	LC-MS/MS	85
8.2.2	HPLC-FLD.....	85
8.2.3	Präparative HPLC.....	85
8.2.4	Sonstige Geräte.....	86
9	Abbildungsverzeichnis	87
10	Tabellenverzeichnis	90
11	Abkürzungsverzeichnis.....	91
12	References.....	93
13	Anhang.....	112
13.1	Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen.....	112
13.1.1	¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten in CDCl ₃	112
13.1.2	CID-Spektren.....	115
13.1.3	UV-Spektren.....	116
13.2	Chromatographische Methoden	117
13.2.1	LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Proteinmodifikationen	117
13.2.2	LC-MS/MS-Methode zur Detektion von NDPO ₂	118
13.2.3	HPLC-Methode zur Anreicherung von GLAP und OP-Lysin	118
13.2.4	HPLC-Methode zur Anreicherung von <i>meta</i> -DLP.....	119
13.2.5	HPLC-Methode zur Quantifizierung von Ribose.....	119
13.2.6	MS/MS-Übergänge der Proteinmodifikationen	120
13.3	Charakterisierung Kartoffelchips.....	121
14	Lebenslauf.....	122
15	Eigenständigkeitserklärung.....	123

1 Einleitung

Die thermische Zubereitung von pflanzlichen und tierischen Bestandteilen dient seit Jahrtausenden zur Verbesserung der Haltbarkeit und des Geschmacks von Lebensmitteln. Die dadurch auftretende Maillard-Reaktion spielt eine wichtige Rolle für die Ausbildung charakteristischer Farb- und Aromaeindrücke, insbesondere beim Rösten von Kaffee, Backen von Brot und Frittieren von stärkehaltigen Lebensmitteln. Generell beschreibt die Reaktion die Interaktion zwischen Proteinen und Kohlenhydraten und führt in einer komplexen Reaktionskaskade zu einem breiten Produktspektrum.^{1,2} Neben der gewünschten Farb- und Aromabildung tritt auch die unerwünschte Glykierung von Proteinen ein, die unter anderem zum Verlust der biologischen Wertigkeit und Funktionalität dieser Proteine führt. Diese stabilen proteingebundenen Aminosäurederivate werden als Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bezeichnet und können außerdem funktionelle physiologische Veränderungen hervorrufen.³ Die Gesamtheit der AGEs ist auch nach über 100 Jahren Forschung nicht vollständig aufgeklärt. Durch intensive Untersuchungen von Modellreaktionen konnten grundlegende Bildungsmechanismen zentraler Maillard-Produkte entschlüsselt werden. Eine dennoch nur wenig erforschte Strukturklasse stellen die Pyridinium-AGEs dar. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften werden diese in Zusammenhang mit der Bildung von oxidativem Stress gebracht und spielen eine Rolle bei der Entstehung von Katarakt.^{4,5} Die Bedeutung und das Vorkommen dieser Strukturen in prozessierten Lebensmitteln ist bis heute noch ungeklärt.

In thermisch behandelten Lebensmitteln können AGEs als Prozesskontaminanten betrachtet werden. Die Bildung dieser Strukturen wird, insbesondere beim Frittieren, durch hohe Temperaturen und eine geringe Wasseraktivität begünstigt. In frittierten Kartoffelprodukten zählt Acrylamid seit dem Jahr 2002 zu dem am intensivsten untersuchten Maillard-Produkt. Eine umfassende Charakterisierung, Identifizierung und Quantifizierung der entstehenden AGEs ist bis heute nicht erfolgt. Gleichzeitig stellen die gastrointestinale Absorption und die Metabolisierung glykierter Proteine Gegenstand aktueller Forschung dar. Die Analyse und Aufklärung von AGEs sowie deren grundlegenden Bildungsmechanismen können einen Beitrag zur Optimierung des Herstellungsprozesses leisten, indem die Entstehung ausgewählter Strukturen minimiert wird.

2 Aktueller Stand der Forschung

2.1 Die Maillard-Reaktion

Die Maillard-Reaktion stellt eine der bedeutsamsten lebensmitteltechnologischen sowie -chemischen Reaktionen der Gegenwart dar. Die auf den französischen Mediziner und Chemiker Louis Camille Maillard (* 1878 - † 1936) zurückzuführende Namensreaktion beschreibt die Reaktion von reduzierenden Carbonylverbindungen mit Aminkomponenten.¹ Dabei stellt die nicht-enzymatische Bräunungsreaktion keinen einzelnen bestimmten chemischen Mechanismus dar, sondern eine komplexe Reaktionskaskade mit einem sehr heterogenen Produktspektrum. Neben der Relevanz in prozessierten Lebensmitteln wird die Bedeutung dieser Reaktion bei pathologischen Prozessen diskutiert.³

Die braunen, hochmolekularen Endprodukte – auch als Melanoidine bezeichnet – besitzen einen wesentlichen Einfluss auf das Aroma und die Farbe von prozessierten Lebensmitteln.^{6,7} Neben den Melanoidinen werden in Folge der Maillard-Reaktion reaktive, niedermolekulare Verbindungen gebildet sowie stabile posttranslationale Aminosäure- und Proteinmodifikationen (Advanced Glycation Endproducts, AGEs). Die Bildung dieser Produkte wird durch hohe Temperaturen und eine geringe Wasseraktivität begünstigt.^{8,9} Ebenso beeinflussen der pH-Wert und das Redoxpotential der Umgebung die Reaktion.^{10,11}

2.1.1 Anfangsphase

Generell lässt sich die Maillard-Reaktion in drei Phasen einteilen. In der Initial- oder Anfangsphase greift die freie Aminogruppe einer Aminosäure nucleophil an die Carbonylfunktion eines offenkettig vorliegenden Zuckers an (Abb. 1). Durch Mutarotation stehen die offenkettige und die cyclische Form der Kohlenhydrate im Gleichgewicht, wobei die freie Carbonylstruktur für die Reaktivität verantwortlich ist. In wässrigen Lösungen liegt Glucose zu 0,0026% als Aldose vor.¹² Das Gleichgewicht wird sowohl von Säuren als auch Basen katalysiert. In Gegenwart von basischen Aminosäuren, wie z.B. Lysin, bilden sich unter Wasserabspaltung Imine, die sogenannten Schiff'schen Basen. Die Hydroxylfunktion in α -Position ermöglicht eine tautomere Umlagerung zum 1,2-Enaminol, welches sich anschließend zum Amadori-Produkt umlagert.¹³ Die Aminoketose ist das erste relativ stabile Maillard-Zwischenprodukt und wird über Aldosen gebildet. Auch Ketosen zeigen diese Isomerisierung. Fructose reagiert zunächst zum Ketoimin und führt in der sogenannten Heyns-Umlagerung zur Aminoaldose, dem Heyns-Produkt.¹⁴ Das Amadori- sowie das Heyns-Produkt

stellen reaktive Verbindungen dar, die über Enolisierungs- und Fragmentierungsreaktionen zu vicinalen α -Dicarbonylen abgebaut werden.

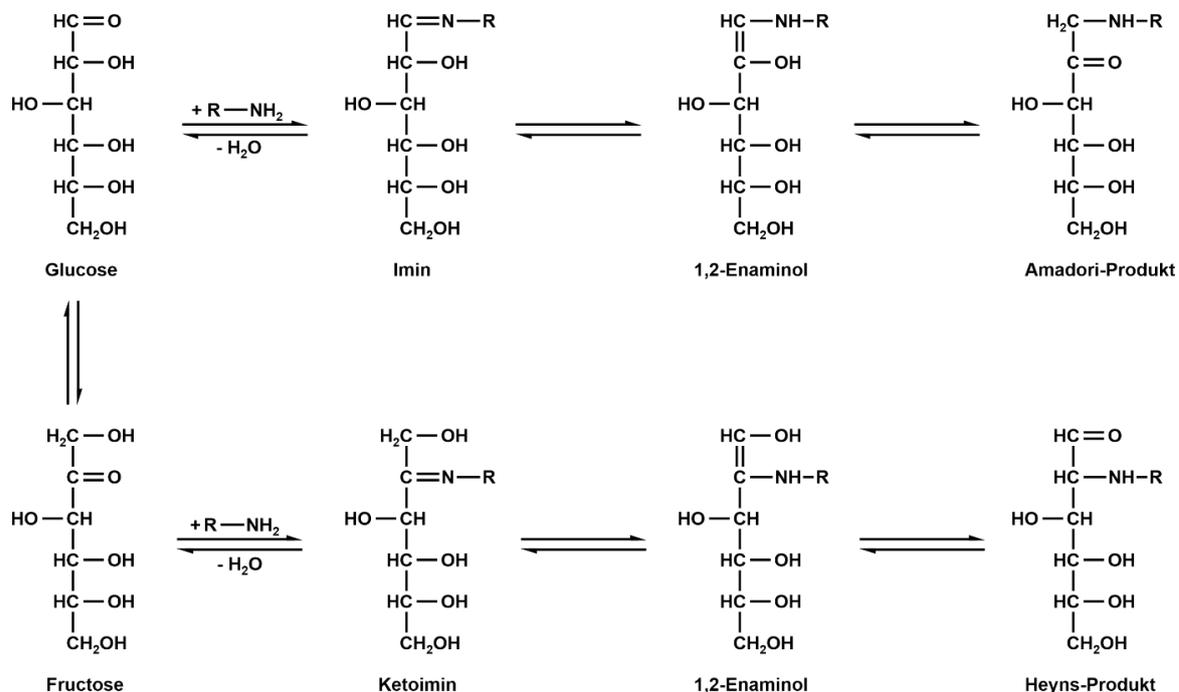


Abb. 1: Initialphase der Maillard-Reaktion

2.1.2 Entstehung reaktiver Intermediate

In der 2. Phase der Maillard-Reaktion, der fortgeschrittenen Phase, kommt es zur Umlagerung und zum Abbau des Amadori-Produktes sowie entsprechender Analoga unter Ausbildung von Desoxyosonen (Abb. 2). Infolgedessen bilden sich aus diesen Fragmentierungsprodukte in Form von reaktiven Carbonylstrukturen. Die Säure- und Basen-katalysierte Enolisierung des Amadori-Produktes führt zunächst zum 1,2-Enaminol oder dem 2,3-Endiol. 3-Desoxyglucoson (3-DG) wird über das 1,2-Enaminol durch β -Eliminierung der Hydroxylgruppe am C_3 -Atom und anschließender hydrolytischer Abspaltung der Aminosäure gebildet. Die β -Eliminierung kann bei dem 2,3-Endiol sowohl über die Aminosäure am C_1 -Atom als auch über die Hydroxylfunktion am C_4 -Atom erfolgen. Bei Abspaltung der Aminkomponente kommt es zur Bildung von 1-Desoxyglucoson (1-DG), bei der Eliminierung der Hydroxylgruppe entsteht 1-Amino-1,4-Didesoxyglucoson (1-A-1,4-DDG).^{15,16} Der Nachweis des Lederer-Glucosons beweist, dass die Enolisierung über das komplette Kohlenstoffgrundgerüst verläuft. Die Bildung erfolgt nach Wasserabspaltung und abschließender tautomerer Umlagerung aus dem 5,6-Endiol.¹⁷ Der oxidative Abbau des Amadori-Produktes führt ebenfalls zur Bildung von Desoxyosonen. So steht die Autoxidation bzw. die aminkatalysierte Oxidation des Amadori-Produktes zum Glucoson in Konkurrenz zu den Enolisierungsreaktionen.^{18,19} Die

gebildeten Desoxyosone weisen aufgrund ihres α -Dicarbonylcharakters eine hohe Reaktivität auf. Insbesondere 1-DG und Glucoson sind hinsichtlich ihrer Reduktonstruktur stark redoxaktiv, fragmentieren leicht und sind von besonderer Bedeutung im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion.

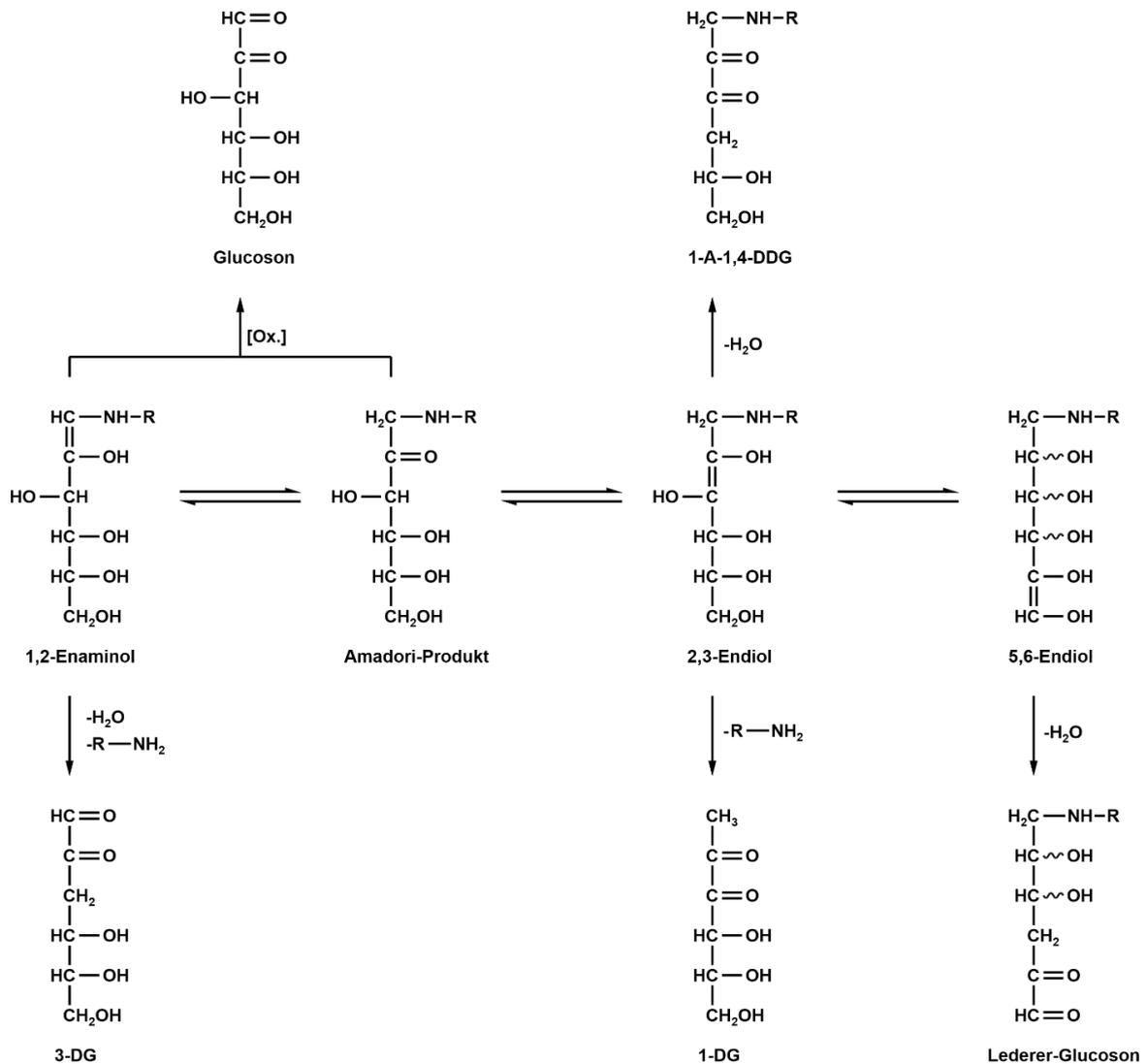


Abb. 2: Bildung von Desoxyosonen

Als grundlegende Mechanismen für den Abbau von Desoxyosonen werden Retro-Aldol-Reaktionen, β -Dicarbonylsplaltungen, sowie α -Dicarbonylsplaltungen in der Literatur beschrieben.^{20,21} Letztere lassen sich dabei in eine hydrolytische und eine oxidative Umsetzung differenzieren. Bei der β -Dicarbonylsplaltung wird zwischen der hydrolytischen sowie der amininduzierten β -Dicarbonylsplaltung unterschieden.²² Aktuelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Retro-Aldol-Splaltung und die hydrolytische α -Dicarbonylsplaltung keine Bedeutung besitzen.^{22,23} Davidek *et al.* identifizierten in isotoopenmarkierten Modellinkubationen die hydrolytische β -Dicarbonylsplaltung als Hauptweg für die Zucker-

fragmentierung. Der Mechanismus verläuft nach dem Prinzip einer Retro-Claisen-Kondensation. Hierbei erfolgt der nucleophile Angriff eines Hydroxid-Ions am Carbonylkohlenstoff einer Reduktonstruktur und löst dabei die Bildung von kurzkettigen Carbonsäuren und α -Hydroxycarbonylverbindungen aus.^{23,24} Zudem können Amine als Nucleophile reagieren und führen somit zur amininduzierten β -Dicarbonylsplaltung.^{22,25} Die oxidative α -Dicarbonylsplaltung wurde mehrfach durch Experimente mit isotoopenmarkiertem Sauerstoff bestätigt.^{22,26} Dabei kommt es, ausgelöst durch den Angriff einer reaktiven Sauerstoffspezies an der C₂- oder C₃-Carbonylfunktion unter Bildung eines Alkoxyradikals, zu Ein-Elektronen-Übergängen. Das entstandene Hydroperoxid-Anion durchläuft eine Baeyer-Villiger-ähnliche Umlagerung unter anschließender Hydrolyse. Im Vergleich zur hydrolytischen β -Dicarbonylsplaltung spielt dieser Mechanismus eine untergeordnete Rolle.²⁶ Die aus dem Abbau der Desoxyosen resultierenden Verbindungen erweitern wiederum das Produktspektrum der Maillard-Reaktion und reichen von kurzkettigen α -Dicarbonylen, über α -Hydroxycarbonylen bis hin zu Carbonsäuren. Einige ausgewählte Vertreter sind in Abb. 3 dargestellt.

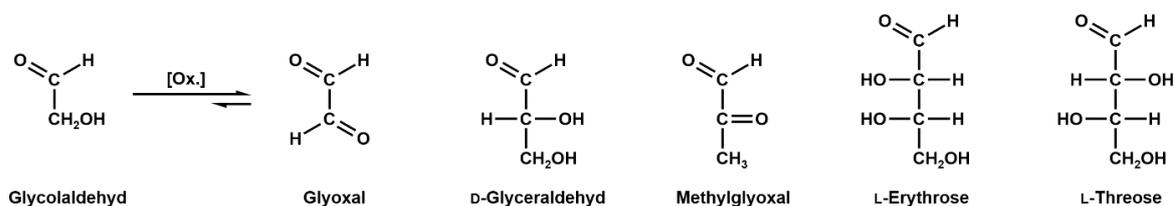


Abb. 3: Reaktive Carbonylverbindungen

Eines der am intensivsten untersuchten α -Dicarbonyle stellt Glyoxal (GX) dar, welches auf vielfältigen Wegen gebildet werden kann. In der Literatur wird eine Bildung über eine Retro-Aldol-Splaltung direkt aus Glucose diskutiert.²⁷ Darüber hinaus gilt Glucoson als Vorstufe für die oxidative Bildung von Glyoxal.²⁸ Ein weiterer Bildungsweg wurde von Namiki *et al.* beschrieben und von Hofmann *et al.* detailliert untersucht.^{28,29} Des Weiteren konnte die Entstehung von Glyoxal infolge der Autoxidation von Glucose unter physiologischen Bedingungen gezeigt werden.³⁰ Neben der Zuckerfragmentierung stellt auch die Lipidperoxidation eine wichtige Quelle für die Bildung von GX dar. Vor allem Abbauprodukte von ungesättigten Fettsäuren, wie z.B. 2,4-Heptadienal und 2-Nonenal gelten als Vorläuferstrukturen.^{31,32} Glycolaldehyd (GA) stellt das nicht oxidierte Pendant zu GX dar, kann aber im Sinne einer aminkatalysierten Oxidation leicht zu diesem reagieren. Durch Untersuchungen von Voigt *et al.* konnte die Bildung von GA ausgehend von 3,4-Dihydroxy-1-oxo-butanal (Threoson), einem Abbauprodukt von 1-DG, infolge einer β -Dicarbonylsplaltung beschrieben werden.³³ Des Weiteren entsteht der reaktive C₂-Körper enzymatisch über das

Myeloperoxidase-H₂O₂-Chlorid-System.³⁴ GA und GX stehen über ein Redoxsystem im Gleichgewicht.²⁸ Klaus *et al.* zeigten, dass das Verhältnis *in vivo* von freiem GA zu freiem GX bei ca. 55:45 liegt.³⁵ GA stellt somit eine der quantitativ bedeutendsten Vorläuferstrukturen für AGEs *in vivo* dar. Methylglyoxal (MGX) ist ein reaktiver C₃-Körper und kann enzymatisch und nicht-enzymatisch aus den Triosephosphaten Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat entstehen.^{36–38} Die Bildung über die Fragmentierung von Glucose im Sinne der Maillard-Reaktion ist unter physiologischen Bedingungen sehr gering.¹⁹ Ebenso ist die Entstehung über 1-DG³⁹, 3-DG¹⁹, Glucoson¹⁹ sowie Ascorbinsäure⁴⁰ unter milden Bedingungen geringfügig.

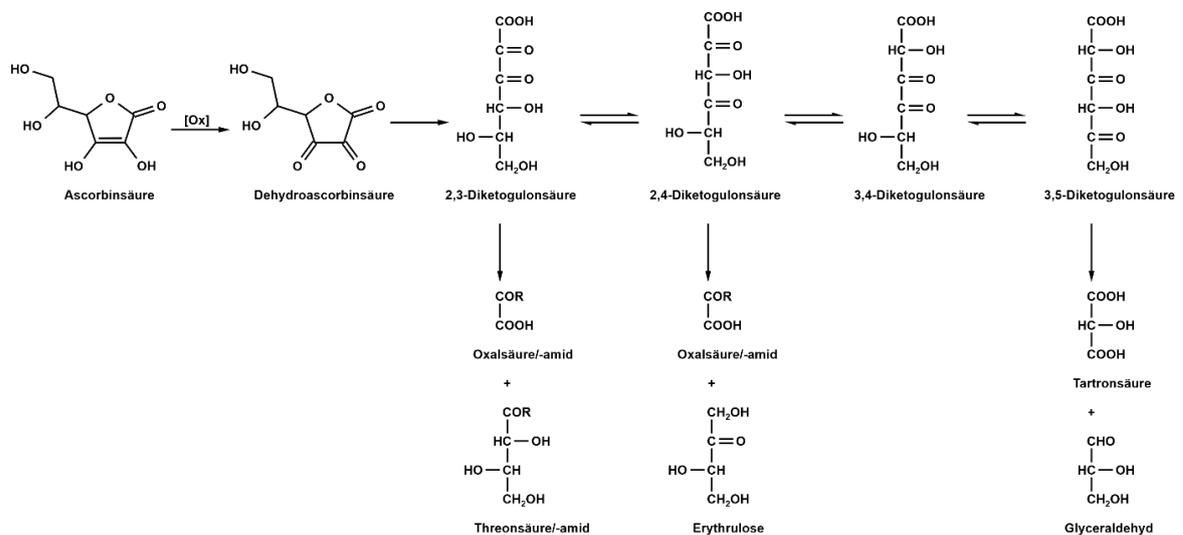


Abb. 4: Abbauwege von Ascorbinsäure nach Smuda *et al.*⁴⁰

Ein weiteres wichtiges Intermediat der nicht-enzymatischen Bräunung ist Glyceraldehyd (G3). Weenen *et al.* postulierten die Bildung des α -Hydroxycarbonyls ausgehend von 1-DG via Retro-Aldol-Fragmentierung mithilfe von isotoopenmarkierter 1-¹³C Glucose.²¹ In weiteren Untersuchungen konnte das bei der Reaktion resultierende Gegenstück MGX nur in Spuren nachgewiesen werden, sodass dieser Bildungsweg ausgeschlossen werden kann. Vielmehr wurde die Entstehung über Threoson infolge einer β -Dicarbonylsplaltung vorgeschlagen.³³ Im Zentralnervensystem wird G3 während der Glykolyse ausgehend vom Glycerinaldehyd-3-phosphat durch Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase generiert.⁴¹ Zudem führt die Fragmentierung von Ascorbinsäure zur Bildung von G3 und weiteren reaktiven Verbindungen. Aufgrund der α -Oxoendiolstruktur wird Ascorbinsäure leicht zu Dehydroascorbinsäure oxidiert (Abb. 4). Dieses kann anschließend irreversibel zu 2,3-Diketogulonsäure hydrolysieren. 2,3-Diketogulonsäure kann über oxidative α -Dicarbonylsplaltungen und β -Dicarbonylsplaltungen zu verschiedenen Carbonsäuren und α -Hydroxycarbonylen reagieren.⁴⁰

Oxalsäure, Threonsäure und Erythrulose stellen die quantitativ bedeutsamsten Abbauprodukte dar.^{42,43} Smuda *et al.* konnten in Modellinkubationen mit verschiedenen Isotopomeren ¹³C-markierter Ascorbinsäure zeigen, dass G3 ausschließlich vom C₃-C₆-Atomen stammt.⁴⁰

2.1.3 Bildung von Advanced Glycation Endproducts

Neben den sensorisch aktiven Melanoidinen stellen AGEs ebenfalls stabile Endprodukte der Maillard-Reaktion dar. Die Bildung von AGEs ist auf die Reaktion der zuvor gebildeten Carbonylstrukturen mit einer primären Aminogruppe zurückzuführen. Primäre Aminogruppen werden bei proteingebundenen Aminosäuren, wie sie *in vivo* und in Lebensmitteln vorliegen, ausschließlich von der Aminosäure Lysin repräsentiert. Daneben spielt die Guanidinfunktion von Arginin bei der Entstehung von AGEs eine entscheidende Rolle. Unter physiologischen und lebensmittelcharakteristischen Bedingungen liegen beide Aminosäuren protoniert vor. Dies ist auf den pK_s-Wert der funktionellen Gruppe von Lysin (ϵ -Aminogruppe, pK_s = 10,5)⁴⁴ und von Arginin (δ -Guanidinogruppe, pK_s = 10,3)⁴⁵ zurückzuführen. Untersuchungen von Isom *et al.* zeigten jedoch, dass interne Lysinseitenketten von Staphylokokken-Nucleasen zum Teil einen pK_s-Wert von unter 6 aufwiesen und bei einem pH-Wert von 7 somit neutral vorliegen.⁴⁶ Für die Guanidinfunktion von Arginin trifft dies nicht zu, diese liegt immer kationisch vor.⁴⁷ In der protonierten Form stellen diese funktionellen Gruppen schlechte Nucleophile dar und reagieren nicht-stöchiometrisch mit den Carbonylstrukturen. Während Lysin die Maillard-Reaktion auslöst, reagiert Arginin nicht mit Hexosen, sondern nur mit α -Dicarbonylen, die während der fortgeschrittenen Phase entstehen.¹⁵ Dennoch sind quantitativ bedeutsame Mengen von Argininmodifikationen in Lebensmitteln und menschlichem Gewebe nachweisbar.^{48,49} Dies liegt unter anderem daran, dass GX und MGX bevorzugt mit Argininseitenketten reagieren.^{50,51} Im Gegensatz dazu weist GA eine höhere Affinität zu Lysin auf.⁵² Die daraus resultierenden Strukturen reichen über monovalente Modifikationen einzelner Aminosäuren bis hin zu bivalenten Modifikationen zweier Aminosäuren. Diese sogenannten Crosslink-Strukturen können einerseits intramolekular innerhalb desselben Proteins auftreten, andererseits aber auch zur kovalenten intermolekularen Verknüpfung mehrerer verschiedener Proteine führen. Somit stellen AGEs in Bezug auf die chemische Struktur und biologische Wirksamkeit eine vielfältige Substanzklasse dar.

Eine der quantitativ bedeutendsten Proteinmodifikationen ist N⁶-Carboxymethyllysin (CML). Ahmed *et al.* identifizierten CML als erstes AGE *in vivo* und beschrieben dessen Bildung ausgehend vom Amadori-Produkt von Glucose infolge einer oxidativen Fragmentierung.⁵³ Ein weiterer Bildungsweg ist die Reaktion von GX mit Lysin. Über Enolisierungsschritte führt zunächst das dabei entstehende Glyoxal-Imin zu CML.³⁰ Zudem kann die Proteinmodifikation

aus der Lipidperoxidation oder der Autoxidation von Ascorbinsäure entstehen.^{54,55} Henning *et al.* stellten einen weiteren, oxidativ-radikalisch-unterstützten Reaktionsmechanismus vor, welcher auf der Kondensation zweier GA-Imine aus der Reaktion von GA mit Lysin basiert.⁵⁶ *N*⁶-Carboxyethyllysin (CEL) ist das MGX-Analogon zu CML. Die Vielfalt der Reaktionsprodukte wird durch die Amid-AGEs deutlich, die eine eigenständige Klasse unter den AGEs bilden. Neben den monovalenten Lysinmodifikationen *N*⁶-Formyllysin, *N*⁶-Acetyllysin, *N*⁶-Lactoyllysin, *N*⁶-Glycolyllysin und *N*⁶-Glycerinyllysin sind lediglich Glyoxal-Lysinamid (GOLA) und Methylglyoxal-Lysinamid (MOLA) als Amid-Crosslinks aufzuführen.^{25,57–59} Baldensperger *et al.* konnten das Produktspektrum mit der Identifizierung von α -Oxoamiden *in vitro* und *in vivo* erweitern.⁶⁰ Ein weiteres bedeutendes Maillard-Produkt stellt das 1968 erstmals beschriebene *N*⁶-(2-Furoylmethyl)-L-Lysin (Furosin) dar (Abb. 5).⁶¹ Furosin stellt ein Artefakt aus der sauren Totalhydrolyse dar und entsteht zu etwa 40 Mol-% aus dem Amadori-Produkt, wodurch dessen analytische Erfassung ermöglicht wird.⁶² Dabei wird diese Struktur als einer der spezifischsten und frühesten Indikatoren für die Maillard-Reaktion angesehen und gilt als Parameter für die Qualitätsveränderungen von Lebensmitteln während der Prozessierung und Lagerung.^{62–64}

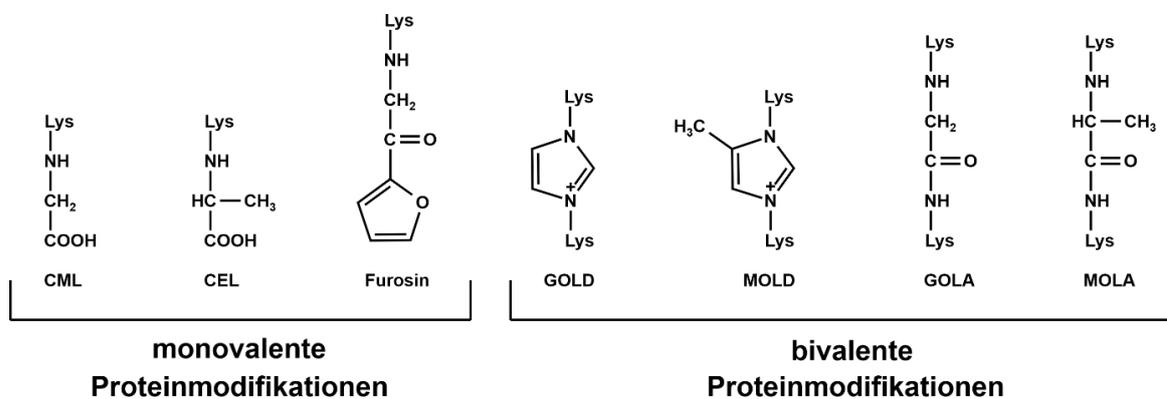


Abb. 5: Übersicht von mono- und bivalenten Proteinmodifikationen

Wie bereits erwähnt, reagieren auch Argininseitenketten von Proteinen mit α -Dicarbonylen. So entsteht bei der Reaktion von Arginin mit GX das Dihydroxyimidazolidin (G-DH). Unter physiologischen Bedingungen stellt G-DH zunächst das Primärprodukt dar und wird langsam zu *N*⁷-Carboxymethylarginin (CMA) abgebaut (Abb. 6). Unter stark sauren Bedingungen werden beide Strukturen vollständig zum Hydroimidazol (G-H) umgewandelt. Für diese Strukturen sind verschiedene Konstitutionsisomere mit unterschiedlicher Stellung der δ -Aminogruppe bekannt. Das δ -Stickstoffatom kann einerseits als endocyclische (G-H2 und G-H3) oder exocyclische Struktur (GH-1) vorliegen.⁶⁵ Zwischen den Hydroimidazolonen und CMA stellt sich ein pH-Wert-abhängiges Gleichgewicht ein. Unter neutralen und basischen

Bedingungen werden die Hydroimidazolone quantitativ zum CMA hydrolysiert, bei pH-Werten unter 2 liegt das Gleichgewicht auf der Seite der Hydroimidazolone. G-H3 konnte in keiner Modellreaktion nachgewiesen werden und stellt ein Artefakt der sauren Aufarbeitung dar. Somit kann es bei der sauren Hydrolyse von Proteinen als Summenparameter für CMA und G-DH angesehen werden. Für die Quantifizierung von CMA ist dadurch eine enzymatische Hydrolyse von Proteinen notwendig.

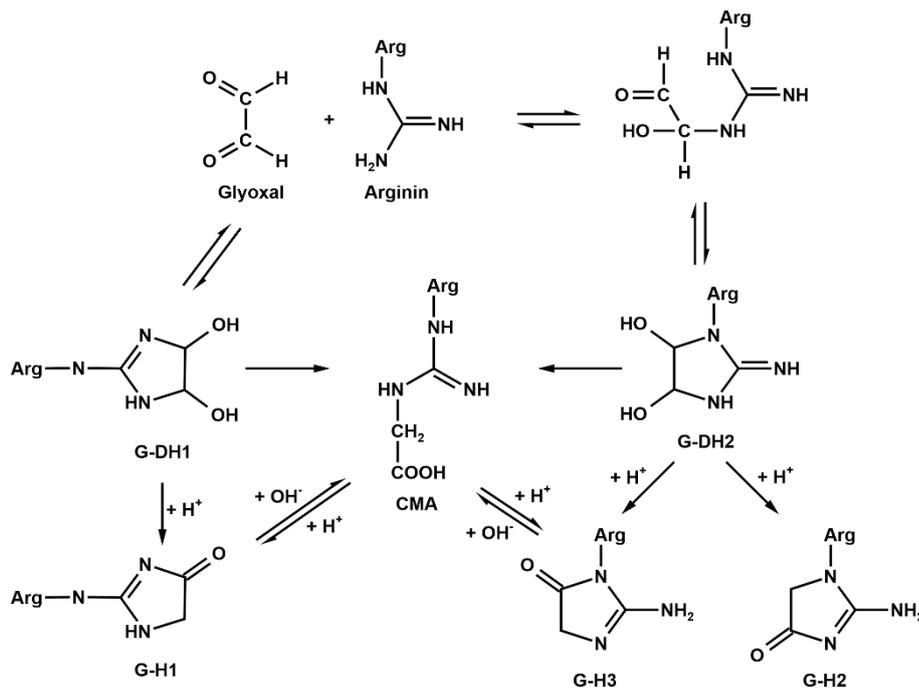


Abb. 6: Bildung monovalenter Arginin-Modifikationen

Entscheidend für die Quervernetzung von Proteinen ist die Ausbildung von Crosslinks. Diese spielen vor allem *in vivo* im Zuge der Alterung eine bedeutende Rolle. Vor allem langlebige Proteine neigen zur Veränderung ihrer mechanischen und biologischen Funktion durch die Akkumulation von Maillard-Produkten. So korrelierten steigende Konzentrationen an bivalenten AGEs mit der Versteifung von Gewebe. Jost *et al.* detektierten erhöhte Gehalte an Glucosepan in gealterten Rattenschwanzsehnen.⁵⁹ Glucosepan ist ein Lysin-Arginin-Crosslink und wird über das Lederer-Glucoson ausgehend von Glucose gebildet.⁶⁶ Während Glucosepan das Hauptcrosslink in Kollagen darstellt, konnten Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD) und Methylglyoxal-Lysin-Dimer (MOLD) nicht nachgewiesen werden.^{59,67} Des Weiteren konnten GOLD und MOLD nur in geringfügigen Konzentrationen im Blutplasma von urämischen und diabetischen Patienten quantifiziert werden.^{68,69} Trotz der geringen physiologischen Relevanz stellt GOLD in Modellinkubationen das Lysin-Lysin- Hauptcrosslink dar. Für die Bildung des säurestabilen Imidazolium-Crosslinks reagieren zwei Moleküle Lysin mit einem Molekül GX

zunächst zum Glyoxal-Diimin. Ein weiterer Angriff eines GX-Moleküls führt unter Abspaltung von Ameisensäure zu GOLD.⁵⁸

2.2 Pyridinium-Proteinmodifikationen

Pyridinium-AGEs sind eine strukturell abgegrenzte Gruppe der posttranslationalen Proteinmodifikationen, die im Rahmen der Endphase der Maillard-Reaktion gebildet werden. In der Literatur konnten bereits ca. 20 Verbindungen dieser Strukturklasse identifiziert werden, jedoch sind die Bildungsmechanismen teilweise noch ungeklärt. In Abb. 7 sind ausgewählte mono- und bivalente Pyridinium-Proteinmodifikationen dargestellt.

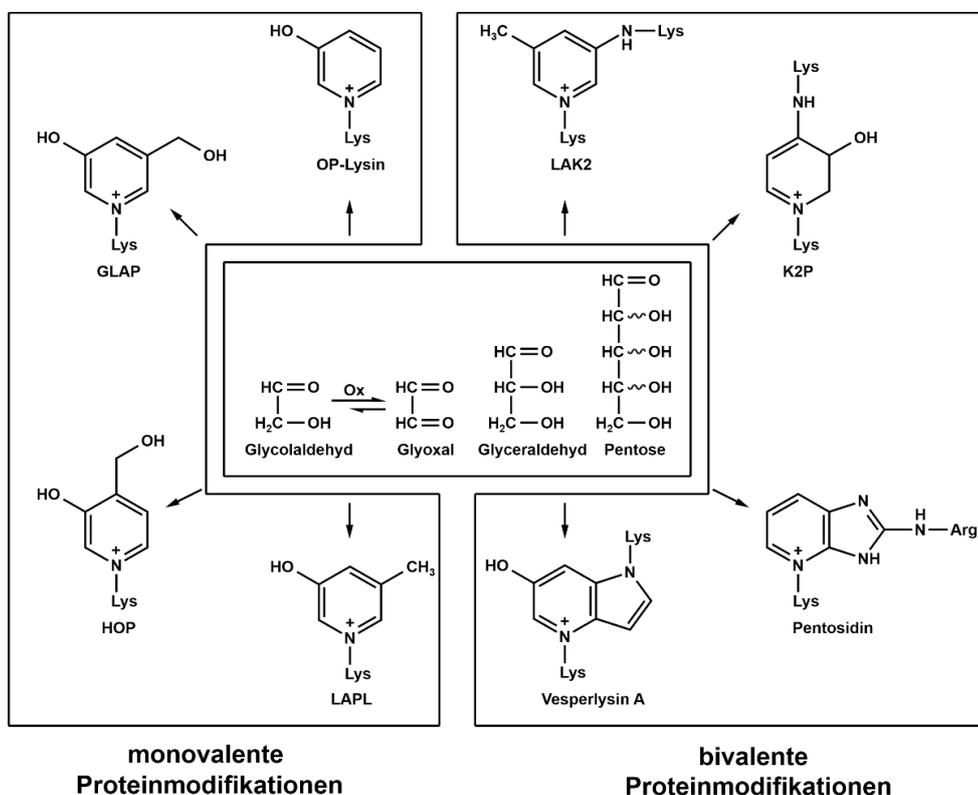


Abb. 7: Überblick über mono- und bivalente Pyridinium-AGEs

Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften und dem Vorkommen im Augenlinsenprotein werden den Pyridinium-AGEs eine besondere Rolle bei der Linsentrübung (Katarakt) zugeschrieben.^{5,70} Die erst kürzliche Identifizierung von zwei neuartigen Pyridinium-AGEs zeigt, dass diese Strukturklasse Gegenstand aktueller Forschung ist.⁷¹

2.2.1 Strukturen und Bildungswege

Die wohl bekannteste Proteinmodifikation mit einem Pyridiniumgrundkörper ist der im Jahr 1989 durch Sell *et al.* identifizierte Arginin-Lysin-Crosslink Pentosidin.⁷² Dessen Bildung

erfolgt ausgehend vom 4,5-Endiol einer Pentose (Lederer-Pentose). Anschließende Cyclisierung und Dehydratisierung führen zunächst zu einem intramolekularen Aldimin, welches dann mit der Guanidinofunktion von Arginin reagiert.⁷³ Die analoge bivalente Lysin-Lysin Struktur ist Vesperlysin A. Im Gegensatz zu Pentosidin wird Vesperlysin A hauptsächlich von Ascorbinsäure ausgehend gebildet.^{74,75} Tessier *et al.* zeigten, dass Threose, ein Abbauprodukt von Ascorbinsäure, die potenteste Vorläuferstruktur ist. Des Weiteren führen Pentosen, insbesondere in Anwesenheit von C₂-Körpern, zum Vesperlysin A. Ein detaillierter Mechanismus wurde jedoch noch nicht beschrieben.⁷⁶ Ein weiteres Lysin-Lysin Crosslink konnte aus kataraktösen Linsen nach enzymatischer Hydrolyse isoliert und charakterisiert werden: Lysin-Lysin-Pyridinium-Dimer (K2P).⁵ Diese Struktur besteht aus einem Dihydropyridinium-Ring und ist unter sauren Bedingungen nicht stabil. Die Diskussion über einen möglichen Bildungsmechanismus steht noch aus, es konnte aber gezeigt werden, dass Ascorbinsäure eine mögliche Vorläuferstruktur ist.⁷⁷ Klaus *et al.* postulierten auf Basis von Modellinkubationen eine mögliche Abbaustruktur von K2P mit Pyridinium-Struktur.⁵²

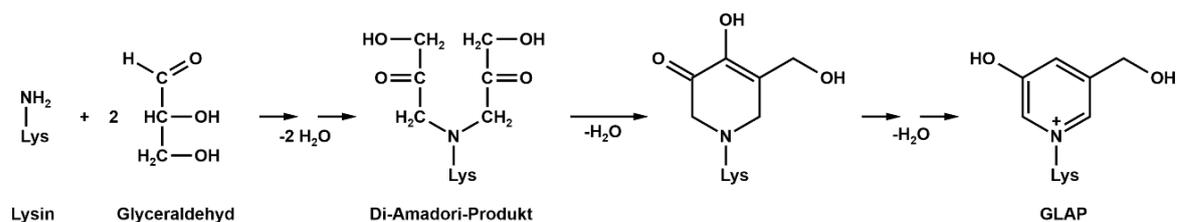


Abb. 8: Postulierter Bildungsmechanismus von GLAP

Entscheidend für die Bildung der Pyridinium-AGEs sind vor allem reaktive kurzkettige Carbonyle, die während der Maillard-Reaktion gebildet werden. So konnten Usui *et al.* 3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridiniumlysin (GLAP) in einer Modellinkubation mit N^α-Acetyllysin und G3 beschreiben.⁷⁸ Weitere Untersuchungen ergaben, dass GLAP ausschließlich vom C₃-Körper und von Glyceraldehyd-3-phosphat gebildet wird und somit ein G3-spezifisches AGE darstellt.⁷⁹ Der Abbau von Glyceraldehyd-3-phosphat, einem Schlüsselintermediat der Glykolyse, gilt als Hauptweg für die Bildung von G3 *in vivo*. Es wird vermutet, dass eine reduzierte Aktivität von Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase den Gehalt an Glyceraldehyd-3-phosphat, G3 und letztendlich auch die Entstehung von G3-spezifischer AGEs erhöht.⁸⁰ Einen möglichen Bildungsmechanismus für GLAP beschreibt die Reaktion der ε-Aminofunktion von Lysin mit zwei Molekülen G3 zum Di-Amadori-Produkt. Eine anschließende Aldolkondensation führt über Ringschluss, Isomerisierung und Dehydratisierung zu GLAP (Abb. 8). Tessier *et al.* erweiterten das Produktspektrum G3-

spezifischer Pyridinium-AGEs und fassten die Proteinmodifikationen unter dem Begriff Triosidine zusammen.⁸¹

Die Verbindung 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridiniumlysin (HOP-Lysin) wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen beschrieben.^{82,83} Die Bildung erfolgt einerseits über Ascorbinsäure und dessen Abbauprodukte, andererseits stellt GA eine zentrale Präkursorstruktur dar. Argirov *et al.* beschrieben die Entstehung von HOP-Lysin ausgehend von drei Molekülen GA. Im ersten Schritt reagieren zwei GA-Moleküle mit der ϵ -Aminofunktion von Lysin zum Di-Amadori-Produkt. Nach Wasserabspaltung und einem weiteren Angriff von GA folgt eine Aldolkondensation und ein Ringschluss. Durch weitere Dehydratisierungen und Isomerisierungen entsteht HOP-Lysin (Abb. 9). Modellinkubationen mit 1-¹³C- und 1,2-¹³C-markierten GA bestätigten diesen Mechanismus.⁸³

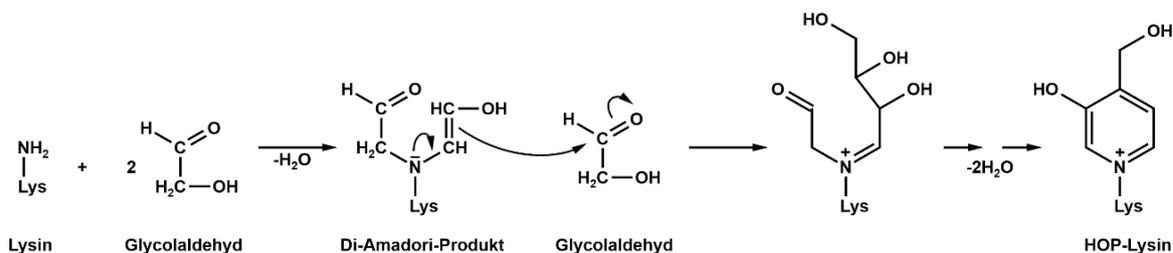


Abb. 9: Bildungsmechanismus von HOP-Lysin

Eine weitere bedeutende monovalente Pyridinium-Proteinmodifikation, 3-Hydroxypyridiniumlysin (OP-Lysin), wurde im Jahr 2004 von Argirov *et al.* beschrieben. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Entstehung von OP-Lysin in anaeroben Modellreaktionen und konnte die Struktur ausschließlich in Mischinkubationen mit GA und G3 detektieren. Das C₅-Grundgerüst wird somit bevorzugt durch einen C₂- und C₃-Körper gebildet. Das Di-Amadori-Produkt gilt als zentrales Intermediat bei der Entstehung von OP-Lysin (Abb. 10). Der Austausch von G3 durch MGX, ebenfalls ein C₃-Körper, führte nicht zur Bildung von OP-Lysin. Daher gilt es als GA-G3-spezifisches AGE. Jedoch wurden diese Untersuchungen lediglich unter nicht-oxidativen Bedingungen durchgeführt.⁴ So kann die Entstehung von OP-Lysin unter oxidativen Bedingungen, beispielsweise über den oxidativen Abbau von Ascorbinsäure, nicht ausgeschlossen werden.

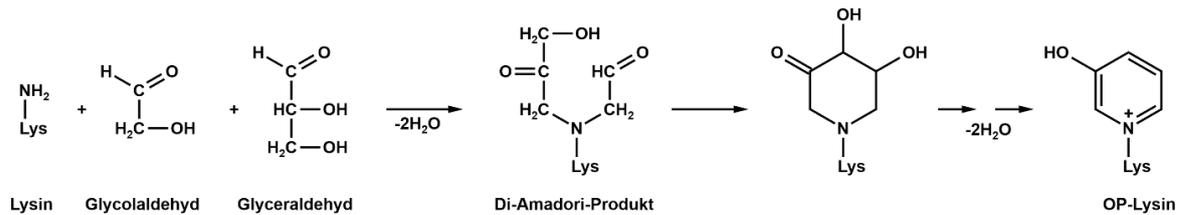


Abb. 10: Postulierter Bildungsmechanismus von OP-Lysin

Shigeta *et al.* und Fujimoto *et al.* identifizierten 2-Hydroxypropanal (Lactaldehyd) als möglichen Präkursor für die Bildung von Pyridinium-AGEs.^{84,85} Lactaldehyd ist ein α -Hydroxycarbonyl und wird ausgehend von L-Threonin durch das Myeloperoxidase-System gebildet.³⁴ Modellinkubationen von Lactaldehyd mit *N*^ε-Acetyllysin führten zur Entstehung einer neuartigen monovalenten (Lactaldehyd-Pyridiniumlysin, LAPL) und einer neuartigen bivalenten Pyridinium-Proteinmodifikation (Lactaldehyd-Pyridiniumlysin-Dimer, LAK-2). Untersuchungen bezüglich weiterer Präkursoren und der Nachweis bzw. die Relevanz der neuartigen Strukturen *in vivo* oder in prozessierten Lebensmitteln blieben allerdings aus. Das Präkursorenspektrum der Pyridinium-AGEs ist breit gefächert und reicht von C₂- bis C₅-Zuckern. Eine zusammenfassende Übersicht ist in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Übersicht der Präkursoren ausgewählter Pyridinium-Proteinmodifikationen

Proteinmodifikation	Präkursor	Literatur
HOP-Lysin	3× GA Erythrose/Threose + GA	83
GLAP	3× G3	78
OP-Lysin	GA + G3	4
LAPL	2× Lactaldehyd	84
LAK-2	2× Lactaldehyd	85
Vesperlysin A	Threose Pentosen + GA/GX	74
Pentosidin	Pentosen	73
K2P	Ascorbinsäure	5

2.2.2 Pyridinium-AGEs als Photosensibilisatoren

Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, ist Ascorbinsäure eine potente Vorläuferstruktur für die Bildung von Pyridinium-AGEs und stellt in menschlichen Augenlinsen aufgrund der relativ hohen Konzentration (~3 mM) den Hauptpräkursor für AGEs dar.^{86,87} So konnten einige Proteinmodifikationen mit einem Pyridiniumgrundgerüst in Augenlinsenproteinen nachgewiesen werden.^{4,5,75,77} Dabei korreliert das Auftreten dieser Strukturen mit kataraktösen

Krankheitsbildern. Aufgrund der UV-Aktivität und der Fluoreszenzcharakteristika sind Pyridinium-AGEs in der Lage, als Photosensibilisatoren reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu bilden.⁸⁸

Zu den ROS gehören zum einen Radikale, wie das Hyperoxid-Anion, das Hydroxy-Radikal und das Peroxyl-Radikal, zum anderen Wasserstoffperoxid, Hydroperoxid und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Im Gegensatz zum Triplett-Sauerstoff (Grundzustand, S_0) sind die Spins der beiden Valenzelektronen bei $^1\text{O}_2$ entgegen der Hundschen Regel antiparallel ausgerichtet. Im Prinzip gelangt bei einer photosensibilisierenden Reaktion der Photosensibilisator durch Absorption von Licht in einen angeregten Zustand (S_1). Der S_1 -Zustand ist allerdings sehr kurzlebig und kann entweder durch Fluoreszenz in den S_0 -Zustand gelangen oder durch Interkombination (Intersystem Crossing, ISC) in einen Triplett-Zustand (T_1), wobei Letzterer stabiler ist.⁸⁹ Eine graphische Darstellung dieser Prozesse zeigt Abb. 11.

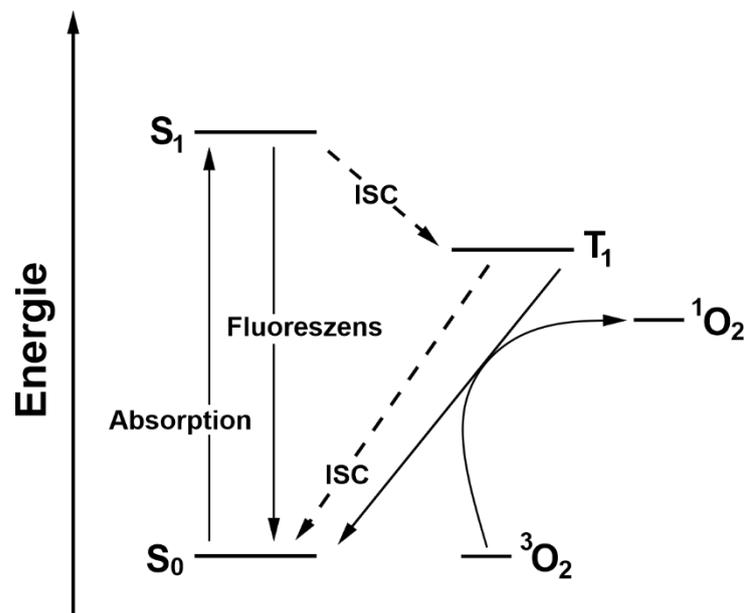


Abb. 11: Anregung und mögliche Relaxationswege eines Photosensibilisators⁸⁹

In Anwesenheit von Sauerstoff findet eine direkte Energieübertragung vom angeregten Photosensibilisatormolekül auf Sauerstoff statt (Typ-II-Reaktion). Dies führt zum einen zur Relaxation des Sensibilisators aus dem T_1 -Zustand in den S_0 -Zustand, zum anderen zur elektronischen Anregung von Sauerstoff in den Singulett-Zustand. Des Weiteren kann der angeregte Photosensibilisator ein Elektron oder ein Wasserstoffatom auf ein Substratmolekül übertragen (Typ-I-Reaktion). Die Radikale, welche aus den primären Typ-I-Prozessen entstehen, können anschließend in Gegenwart von Sauerstoff Peroxyradikale und Hydroperoxide bilden.⁸⁹

Eine Herausforderung stellt die Detektion von $^1\text{O}_2$ aufgrund dessen Kurzlebigkeit dar, wobei typische Lebensdauern im Piko- und Nanosekundenbereich liegen.⁹⁰ Auf der einen Seite kann $^1\text{O}_2$ direkt über Lumineszenz nachgewiesen werden, auf der anderen Seite lässt sich dieser unter anderem mit polycyclischen aromatischen Verbindungen „einfangen“.⁹¹ Hierbei reagieren elektronenreiche Aromaten mit $^1\text{O}_2$ in einer [4+2] Cycloaddition zu den jeweiligen Endoperoxiden. Anthracen-Derivate gelten als spezifische Akzeptoren für $^1\text{O}_2$, können diesen jedoch selbst als Photosensibilisatoren erzeugen.⁹² Im Gegensatz dazu kann die photosensibilisierende Bildung von $^1\text{O}_2$, von Naphthalin-Derivaten ausgehend, ausgeschlossen werden.⁹³ Naphthalin-Derivate werden in der Literatur als $^1\text{O}_2$ -Detektoren beschrieben, reagieren allerdings nur langsam mit diesem.^{94,95} Die daraus resultierenden Naphthalin-Endoperoxide sind bereits unter milden Bedingungen instabil, dennoch ist ein breites Spektrum an wasser- und fettlöslichen Verbindungen bekannt.^{96,97} Einen empfindlichen und spezifischen Nachweis für $^1\text{O}_2$ stellt zudem das Endoperoxid von Sensor-Green (SOGS) dar, welches über Fluoreszenz detektiert werden kann.⁹⁸ Allerdings kann SOGS selbst als Photosensibilisator $^1\text{O}_2$ generieren.⁹⁹ Die Arbeitsgruppe von Ortwerth beschäftigte sich intensiv mit posttranslationalen Proteinmodifikationen abgeleitet von Ascorbinsäure und deren photosensibilisierenden Bildung von ROS. So konnte gezeigt werden, dass bei der Bestrahlung von kataraktösen Linsen mit UV-A-Licht über 90% der generierten ROS auf $^1\text{O}_2$ zurückzuführen war.¹⁰⁰ Weitere Untersuchungen belegten die photosensibilisierte Bildung von $^1\text{O}_2$ durch Vesperlysin A und Pentosidin.¹⁰¹ In biologischen Systemen reagiert $^1\text{O}_2$ schnell mit DNA, Lipiden und Proteinen und führt zum oxidativen Stress. Insbesondere Tryptophan- und Histidinreste werden in kataraktösen Augenlinsen durch die Bildung von $^1\text{O}_2$ geschädigt.¹⁰²

2.3 Proteinmodifizierung im Lebensmittel

Proteine sind biologische Makromoleküle, welche aus Aminosäuren bestehen und über Peptidbindungen miteinander verbunden sind. Grundsätzlich werden mehrere Strukturebenen unterschieden. Die Primärstruktur ist die unterste Ebene und stellt die Aminosäuresequenz dar. Die räumliche Anordnung des Polymerrückgrats (Sekundärstruktur) wird durch nicht-kovalente Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen) stabilisiert. Die häufigsten Typen von Sekundärstrukturelementen sind α -Helices und β -Faltblätter. Diese werden durch zumeist kurze unstrukturierte Bereiche miteinander verbunden. Zu diesen gehören „Loops“ und „Turns“, die auch maßgeblich die Flexibilität eines Proteins bestimmen. α -Helices zeichnen sich durch die gleichmäßige Verdrehung der Polypeptidkette aus, die durch die regelmäßige Ausbildung von

Wasserstoffbrückenbindungen zu einer stabilen Struktur führen. Das Vorkommen bestimmter Aminosäuren beeinflusst die Bildung einzelner Strukturen entlang der Polypeptidkette. So gilt Prolin als „Helixbrecher“ und findet sich häufig in den „Loops“ und „Turns“ wieder. Aromatische Aminosäuren hingegen sind oftmals Bestandteil von β -Faltblättern. Wenn die Stränge von β -Faltblättern antiparallel verknüpft sind, verläuft der N-Terminus des einen β -Stranges in die entgegengesetzte Richtung vom N-Terminus des zweiten Stranges. Bei parallelen β -Faltblättern liegen die N-Termini beider Stränge in gleicher Richtung vor. Die Makrokonformation einer oder mehrerer Polypeptidketten bezeichnet man als Tertiärstruktur. Die Quartärstruktur beschreibt die gegenseitige räumliche Anordnung von zwei oder mehreren Peptiden zueinander. Durch die Ausbildung von kovalenten Disulfidbrücken besitzt Cystein einen maßgeblichen Einfluss auf die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen.¹⁰³

Die Modifizierung von Lebensmittelproteinen kann auf thermischem, physikalischem, enzymatischem, chemischem oder fermentativem Weg erfolgen. Die thermische Behandlung von Lebensmitteln führt zur Konformationsänderung der Proteine. So kommt es ab einer Temperatur von 55 °C zur Veränderung von α -Helices und β -Faltblättern und ab einer Temperatur von 70-80 °C zum vollständigen Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur.^{3,104} Neben der Proteindenaturierung tritt im Rahmen der Maillard-Reaktion auch eine Proteinglykierung auf, die mit einem Verlust von ernährungsphysiologisch essentiellen Aminosäuren einhergeht. Diese strukturellen Veränderungen von Proteinen haben zur Folge, dass deren enzymatischer Verdau und die Absorption über die Darmschleimhaut vermindert sind.^{105,106} In Modellexperimenten konnte gezeigt werden, dass Lysinoalanin im Gegensatz zu CML und N^6 -Fructoselysin (FL) in modifiziertem Casein nicht vom Gastrointestinaltrakt absorbiert wird.¹⁰⁷ Für die Aufnahme von AGEs ist das Molekulargewicht des Proteins von entscheidender Bedeutung. Freie und an niedermolekulare Proteine gebundene AGEs werden in signifikant höheren Mengen absorbiert als höhermolekulare Proteine.^{108,109} AGEs können *in vivo* mit Zelloberflächenrezeptoren interagieren und zu Entzündungsprozessen und zellulären Dysfunktionen führen.¹¹⁰ Der AGE-bindende Rezeptor (RAGE) stellt einen intensiv untersuchten pro-inflammatorischen Rezeptor dar. RAGE ist ein zur Signaltransduktion befähigter Multi-Ligandenrezeptor, der den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert. Dieser induziert wiederum die Aktivierung weiterer pro-inflammatorischer Entzündungsmediatoren, Adhäsionsproteine und Cytokine.¹¹¹ Nicht-absorbierte Proteinmodifikationen kommen in Kontakt mit der Darmflora und können durch diese metabolisiert werden. Modellversuche unter anaeroben Bedingungen demonstrierten, dass die humane Darmflora in der Lage ist freies FL und CML abzubauen.¹¹² Anschließend Untersuchungen identifizierten *N*-Carboxymethylcadaverin, *N*-Carboxymethylpentansäure und *N*-Carboxymethyl- Δ^1 -

piperidinium-Ion als Metabolite von CML. Diese Strukturen wurden von verschiedenen Stämmen von *E. coli* produziert, jedoch nur unter aeroben Bedingungen.¹¹³ Das bedeutet, dass neben *E. coli* weitere Mikroorganismen in der Lage sind, AGEs zu metabolisieren.

Trotz der zahlreichen bekannten Proteinmodifikationen liegt der Fokus vieler Studien auf die Quantifizierung von CML und CEL.¹¹⁴⁻¹¹⁶ In Tab. 2 sind die Gehalte von AGEs in ausgewählten Lebensmittel-Matrices gegenübergestellt.

Tab. 2: Konzentrationen von Proteinmodifikationen in ausgewählten Lebensmittel-Matrices.

Lebensmittel	AGE-Gehalt	Literatur
Weißbrotkruste	CML: 382 mg/kg	114
Weizenbrot	CML: 4,5 mg/kg; CEL: 2,3 mg/kg; CEA: 15 mg/kg; MG-H1: 18 mg/kg; N ^ϵ -Formyllysin: 3,2 mg/kg; N ^ϵ -Acetyllysin: 3,0 mg/kg; Pyrralin: 36 mg/kg	49
Kekse	CML: 10-76 mg/kg; CEL: 2-53 mg/kg; MG-H1: 10-218 mg/kg	117
Milch	CML: 47-119 pmol/mL; Pyrralin: 14-908 pmol/mL	118
Milchpulver	CML: 21,1-128,3 mg/kg; CEL: 13,8-56,6 mg/kg Pyrralin: 2,9-81,5 mg/kg	119
Fisch (gegrillt)	CML: 16,7-50,5 mg/kg; CEL: 45,0-128,3 mg/kg	115
Hähnchenfleisch (gekocht)	CML: 5,0-35,7 mg/kg; CEL: 22,6-140,5 mg/kg MG-H1: 26,7 mg/kg; G-H1: 3,0-7,4 mg/kg MOLD: 0,8-2,9 mg/kg; GOLD: 1,0-2,3 mg/kg	120
Thunfisch (gekocht)	CML: 9,6-40,7 mg/kg; CEL: 35,8-129,6 mg/kg MG-H1: 19,0-46,8 mg/kg; G-H1: 2,8-4,0 mg/kg	120
Rindfleisch (gekocht)	CML: 36,2 mg/kg; CEL: 21,7 mg/kg	116
Schweinefleisch (gegrillt)	CML: 9,2 mg/kg; CEL: 40 mg/kg GOLD: 0,25 mg/kg; GOLLA: 1,2 mg/kg; MOLA: 6 mg/kg	121

Neben den genannten, unerwünschten Eigenschaften bestimmen Proteinmodifikationen weiterhin maßgeblich die Textur, den Geruch und den Geschmack von Lebensmitteln. Die Bildung charakteristischer Aromaeindrücke verläuft unter anderem über den Strecker-Abbau. Hierbei reagieren in einer Redoxreaktion α -Dicarbonyle zu α -Hydroxycarbonylen und Aminosäuren unter Decarboxylierung zu Strecker-Aldehyden (Abb. 12).¹⁰³

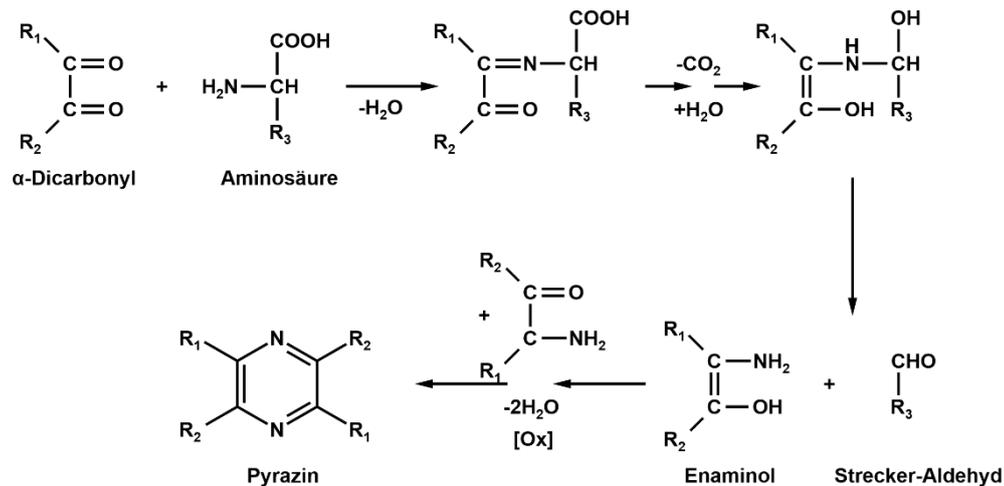


Abb. 12: Strecker-Abbau¹⁰³

Beispielsweise sind Methional und 3-Methylbutanal Leitstrukturen für den Geruch von Kartoffelchips bzw. Schokolade.^{122,123} Auch Pyrazine und Strecker-Säuren, die im Zuge des Strecker-Abbaus gebildet werden, stellen potente Aromastrukturen dar. Die sekundäre Aminosäure Prolin reagiert im Sinne der Strecker-Reaktion mit MGX zu 2-Acetylpyrrolin. Diese Struktur ist ein Schlüsselaroma in Weißbrot und Popcorn und besitzt mit 0,05 µg/kg einen sehr niedrigen Geruchsschwellenwert.¹²⁴ Des Weiteren ist die oxidative Bildung von Disulfidbrücken verantwortlich für die Elastizität von Teig und für die strukturellen Veränderungen beim Braten von Fleisch.^{125,126}

2.3.1 Frittiervorgang und Kartoffelchips

Frittieren ist ein dem Braten verwandter Garprozess, bei dem Lebensmittel bei Temperaturen von 140-180 °C in Kontakt mit Speiseöl kommen. Hierbei dient ein Speiseöl mit einem hohen Rauchpunkt als Massen- und Wärmetransfer-Medium. Das im Lebensmittel gebundene Wasser wird in Folge der Verdunstung in der Randzone nach und nach aus dem Inneren an die Randschicht geführt. Infolge des Wasserentzugs bildet sich an den äußeren Schichten ein poröser und trockener Bereich (Kruste) aus, wobei die Dicke (0,3-2 mm) von der Frittierdauer abhängig ist.^{127,128} Im Bereich der Kruste werden schnell Temperaturen von über 100 °C erreicht, im Inneren hingegen steigt die Temperatur nur langsam an, weil das Verdampfen des Wassers seiner Umgebung Wärme entzieht. Aufgrund der niedrigen Wasseraktivität und der hohen Temperatur kommt es vor allem in der Kruste zur Bildung von Maillard-Produkten.

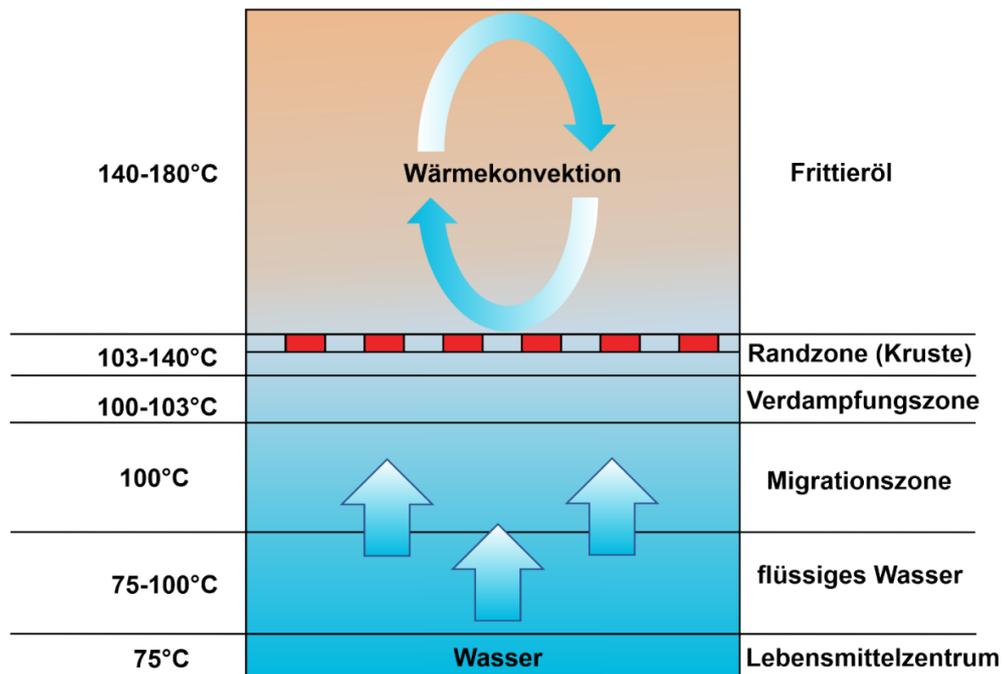


Abb. 13: Wärme- und Massentransfer beim Frittiervorgang nach Gertz *et al.*¹²⁸

Der Frittiervorgang kann in vier grundlegende Schritte eingeteilt werden. Die 1. Phase beschreibt das Eintauchen der rohen Matrix in das heiße Öl, wobei sich die Oberflächentemperatur stark erhöht, allerdings kein Wasser verdampft. In der darauffolgenden 2. Phase verdampft das Wasser auf der Oberfläche und es kommt zur langsamen Ausbildung der Kruste. In der 3. Phase kommt es zur sukzessiven Reduzierung des Wassergehaltes und die Temperatur im Kern beginnt zu steigen. Die letzte Phase ist erreicht, wenn keine sichtbare Verdampfung von Wasser stattfindet. Um die Abläufe beim Frittiervorgang besser zu verstehen, haben Farkas *et al.* in einem Modellsystem, basierend auf der Wärmeleitungsgleichung, den Massen- und Wärmetransfer näher beschrieben. Dabei postulierten sie das Vorliegen zweier Bereiche, den unfrittierten Kern und die frittierte Kruste, welche durch eine Grenzschicht voneinander getrennt sind.^{129,130} Eine vereinfachte schematische Darstellung der Prozesse zeigt Abb. 13. Das Modell vernachlässigte den Einfluss der Öladsorption und wurde für Lebensmittel mit einem hohen Wassergehalt und einer Dicke von 2,5 cm beschrieben. Bei dem Frittieren von Kartoffelscheiben (Dicke < 3 mm) vergrößert sich der Krustenbereich sehr schnell und die Zone des unfrittierten Kerns verschwindet, sodass nach kurzer Zeit in der gesamten Matrix Temperaturen von über 100 °C erreicht werden.

Die unterirdischen Sprossknollen der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum L.*) nehmen hauptsächlich in Europa eine zentrale Rolle als Grundnahrungsmittel ein. Frittierte Kartoffeln, insbesondere Kartoffelchips, repräsentieren einen Bestandteil der westlichen Ernährung. Seit Jahrzehnten sind frittierte Lebensmittel bei Verbrauchern beliebt, vor allem aufgrund des

einzigartigen Zusammenspiels von Geschmack und Textur. Die Qualität der erzeugten Kartoffelchips wird durch die physikochemischen Eigenschaften der Kartoffelknolle beeinflusst. Die genaue chemische Zusammensetzung der Knolle ist abhängig von Sorte, Standort, Erntezeitpunkt und von den Lagerungsbedingungen. Generell setzt sich die Kartoffel aus 77,8% Wasser, sowie 14,8% verfügbare Kohlenhydrate und 2,0% Proteine zusammen.¹³¹ Stärke stellt hierbei den Großteil der vorhandenen Kohlenhydrate dar, besteht zu 20-30% aus Amylose und zu 70-80% aus Amylopektin und trägt mit ca. 75-80% zur Trockenmasse bei. Der Gehalt der Trockenmasse hat einen entscheidenden Einfluss auf die Ölaufnahme und die Knusprigkeit der produzierten Chips.¹³² Rund 75% der Kartoffelproteine gehören zu den wasserlöslichen Albumin- und Globulinfraktionen, während etwa 25% aller Proteine wasserunlöslich und ein wichtiger Bestandteil der Zellwände sind. Die wasserlöslichen Proteine lassen sich in drei Gruppen einteilen: Patatin (40-45 kDa), Proteaseinhibitoren (4-25 kDa) und höhermolekulare Proteine (>87 kDa).¹³³ Das Proteom zeichnet sich durch eine biologisch und ernährungsphysiologisch wertvolle Aminosäurezusammensetzung aus. Neben Asparaginsäure und Glutaminsäure konnten auch essentielle Aminosäuren wie Leucin und Lysin in bedeutsamen Mengen nachgewiesen werden, wobei Letztere maßgeblich für die Maillard-Reaktion ist.¹³⁴ Kartoffelknollen werden unter Lichtausschluss und niedrigen Temperaturen gelagert, um Keimung, Pathogenese und Wasserverlust zu verhindern. Dies führt allerdings zur Akkumulation von reduzierenden Zuckern, dem sogenannten „cold-induced sweetening“ (CIS), wobei Fructose und Glucose die Hauptprodukte darstellen. Das CIS beschreibt einen komplexen Prozess des Kohlenhydratabbaus, bei dem sowohl der enzymatische Stärkeabbau als auch die Glykolyse eine wichtige Rolle spielen.¹³⁵ Cottrell *et al.* konnten in ihren Untersuchungen eine Korrelation zwischen der Aktivität von β -Amylase und der Akkumulation von reduzierenden Zuckern beobachten. Bei einer Lagertemperatur von 4 °C erhöhten sich die Aktivität von β -Amylase und der Gehalt an reduzierenden Zuckern innerhalb der ersten Woche deutlich. Im Gegensatz dazu führte die Lagerung der Kartoffeln bei 10 °C nur zu einer geringfügigen Erhöhung.¹³⁶ Die temperaturabhängige Bildung von reduzierenden Zuckern in Folge der Lagerung von Kartoffeln konnte durch die Untersuchungen von Knowles *et al.* bestätigt werden.¹³⁷ Die gebildeten reduzierenden Zucker können somit im anschließenden Frittierprozess im Sinne der Maillard-Reaktion zur gewünschten Farb- und Aromabildung, allerdings auch zur Bildung unerwünschter, teilweise toxischer Strukturen beitragen.

2.3.2 Veränderungen und Folgeprodukte während des Frittierens

Die drastischen Bedingungen bei dem Frittierprozess führen zu weitgreifenden physikochemischen Veränderungen von Lebensmitteln. Die Ausbildung von Textur und Aroma ist

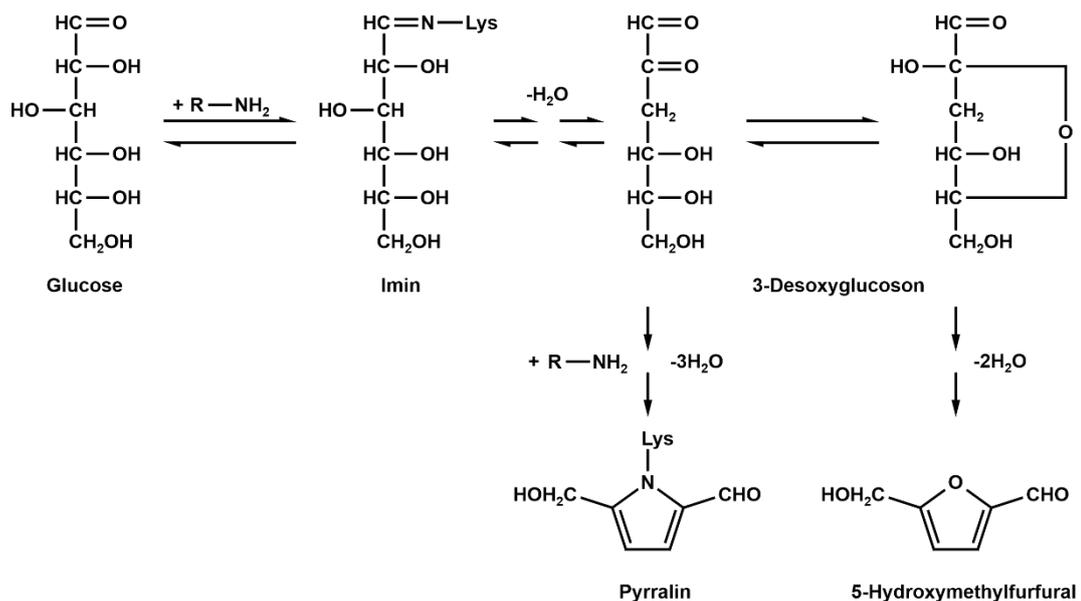
zurückzuführen auf die Veränderung von Proteinen, Fetten und Kohlenhydratketten. Stärkekörner erfahren bei Kontakt mit heißem Öl und in Gegenwart von Wasser zunächst eine Verkleisterung, wobei dieser Prozess grob in zwei Phasen eingeteilt werden kann. Der erste Schritt ist gekennzeichnet durch die sukzessive Vergrößerung der Stärkekörner und der teilweisen Herauslösung der Amylose. Im zweiten Schritt verlieren die Stärkekörner ihre Integrität und es bilden sich Stärke-Lipid-Komplexe aus.¹³⁸ Die Bildung und Stabilisierung solcher Komplexe beinhaltet eine Reihe von nichtkovalenten Wechselwirkungen. Generell werden hierbei die langkettigen und hydrophoben Seitenketten der Fettsäuren in die Helixstruktur von Amylose eingebaut. Die Methylengruppen von [1→4] Glucanen sind nach innen gerichtet und bilden einen unpolaren Hohlraum, die polaren Hydroxylfunktionen hingegen sind nach außen angeordnet. Die Bildung von Stärke-Lipid-Komplexen beeinflusst das Verkleisterungsverhalten, die Retrogradation und die Verdaulichkeit der Stärke.¹³⁹

Neben der Lebensmittelmatrix ist auch das Fett während des Frittierens kontinuierlich oder wiederholt erhöhten Temperaturen in Gegenwart von Luftsauerstoff und Feuchtigkeit ausgesetzt. Speisefette und Öle sind Gemische von Triacylglyceriden. Aufgrund von Hydrolyse, Oxidation und Polymerisation können diese zu freien kurzkettigen Fettsäuren, Mono- und Diglyceriden, Aldehyden, Ketonen und Polymeren reagieren. Im Rahmen der radikalischen Autoxidation, die auf ungesättigte Fettsäuren abzielt, kommt es zur Bildung von Verbindungen, die für das spezifische Aroma der frittierten Produkte verantwortlich sind. Hinsichtlich der Vielfältigkeit des Produktspektrums werden auch unerwünschte Fehlgerüche und reaktive Carbonylstrukturen gebildet. Malondialdehyd stellt ein charakteristisches Sekundärprodukt der Lipidoxidation dar und gilt als Markersubstanz für den oxidativen Verderb von Fetten.¹⁴⁰ Aufgrund der hohen Reaktivität ist es in der Lage proteingebundene Lysin- und Argininseitenketten zu modifizieren.^{141,142} Wie in Kapitel 2.1.2 bereits beschrieben, stellen neben Malondialdehyd auch MGX und GX reaktive Intermediate der Lipidperoxidation dar. Im Vergleich zur Maillard-induzierten Kohlenhydratfragmentierung sind jedoch die gebildeten Mengen von GX und MGX in Folge der Lipidperoxidation vernachlässigbar.¹⁴³ Ledbetter *et al.* konnten in frittierten Kartoffelscheiben Gehalte an freiem GX von $2,21 \pm 0,35$ mg/kg und MGX von $5,44 \pm 1,11$ mg/kg bestimmen.¹⁴⁴ Weitere Untersuchungen umfassen die Bildung von posttranslationalen Proteinmodifikationen während des Frittierens.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ Tab. 3 fasst die Gehalte verschiedener Intermediate und Folgeprodukte der Maillard-Reaktion in frittierten Kartoffelprodukten zusammen.

Tab. 3: Intermediate und Produkte der Maillard-Reaktion in frittierten Kartoffelprodukten

Verbindung	Gehalt [mg/kg]	Literatur
MGX	0,12-5,44	144, 145
GX	0,20-4,28	144, 145
CML	0,15-15	146, 147
CEL	0,24-24	146, 147
HMF	42-65	144, 148
Pyrralin	3,5-14,8	150
Acrylamid	0,15-5,36	154, 158

5-Hydroxymethylfurfural (HMF) gilt als Markerstruktur für die thermische Belastung von Lebensmitteln. Es entsteht erst durch thermisch induzierte Maillard-Prozesse beim Abbau von reduzierenden Zuckern und ist in unprozessierten Lebensmitteln nur geringfügig enthalten.¹⁴⁹ Typische HMF-Gehalte liegen zwischen 40-80 mg/kg, hochprozessierte Lebensmittel besitzen Gehalte über 100 mg/kg.⁴⁹ Pyrralin, ein weiteres Hauptprodukt der Maillard-Reaktion in erhitzten Lebensmitteln, wird in signifikanten Mengen (20-40 mg) mit der täglichen Nahrung aufgenommen.^{150,151} Brotkruste, Zwieback und Kartoffelchips weisen mit 14-200 mg/kg die höchsten Pyrralin-Gehalte auf.¹⁵⁰ Die Bildung erfolgt durch den aminkatalysierten Abbau von Glucose über 3-DG. Der anschließende nucleophile Angriff der ϵ -Aminofunktion von Lysin an das C₂-Carbonylkohlenstoffatom von 3-DG führt nach Wasserabspaltung und Cyclisierung zu Pyrralin (Abb. 14).¹⁵²

**Abb. 14: Bildungsweg von Pyrralin und 5-Hydroxymethylfurfural**

Die intestinale Aufnahme von proteingebundenem Pyrralin erfolgt über die Transporter PEPT 1 und PEPT 2. In den Epithelzellen werden die Proteine hydrolysiert und freies Pyrralin diffundiert durch die basolaterale Zellmembran in den Blutkreislauf.¹⁵³

Acrylamid ist ein bekanntes, carcinogenes Maillard-Produkt, dessen Vorkommen in stark erhitzten Lebensmitteln in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht wurde. Im Jahr 2002 wurde es erstmals in frittierten Kartoffelprodukten nachgewiesen.¹⁵⁴ Die Bildung von Acrylamid erklärt sich aus dem Strecker-Abbau von freiem Asparagin in Gegenwart von reduzierenden Zuckern.¹⁵⁵ Einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Acrylamid haben Frittierdauer und -temperatur, sowie der Gehalt an reduzierenden Zuckern und Asparagin.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Aufgrund der toxischen Eigenschaften dieser Verbindung gibt es zahlreiche Untersuchungen zur Reduzierung des Gehaltes in frittierten Lebensmitteln. Liyanage *et al.* stellten fest, dass das Blanchieren von Kartoffelscheiben mit destilliertem Wasser vor dem Frittieren den Gehalt an Acrylamidgehalt um 59% verringert, wobei die Temperatur des Wassers und die Dauer der Behandlung eine zentrale Rolle spielen.^{159,160}

3 Zielstellung

Die Modifizierung von Proteinen im Rahmen der Maillard-Reaktion ist ein alltägliches Phänomen, welches bei der thermischen Behandlung von Lebensmitteln auftritt, aber auch in Verbindung mit pathophysiologischen Krankheiten gebracht werden kann. Bei dieser Reaktion nehmen kurzkettige und reaktive Carbonyle eine zentrale Position ein und stellen gleichzeitig wichtige Reaktionspartner von Aminosäureseitenketten dar. Insbesondere Arginin und Lysin werden aufgrund ihrer Reaktivität bevorzugt modifiziert. Die daraus resultierenden stabilen Proteinmodifikationen werden unter dem Begriff Advanced Glycation Endproducts (AGEs) zusammengefasst. Zahlreiche Untersuchungen konzentrieren sich auf die Reaktionsmechanismen und Reaktionsprodukte von α -Dicarbonylen. Das Glykierungspotential von α -Hydroxycarbonylen, wie z.B. GA und G3, wurde bislang nur unzureichend untersucht. Diese reaktiven Intermediate spielen insbesondere im Hinblick auf die Bildung von Pyridinium-AGEs eine bedeutende Rolle.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in einer detaillierten Untersuchung der Bildung von Pyridinium-AGEs und deren Vorläuferstrukturen in verschiedenen Modellsystemen. Parallel dazu sollte die praktische Relevanz und die Bedeutung der Strukturen in prozessierten Lebensmitteln aufgezeigt werden. Im Fokus standen hierbei eine neuartige, fluoreszierende Crosslink-Struktur und die monovalenten Verbindungen OP-Lysin, GLAP und HOP-Lysin. Zur Etablierung einer hochsensitiven Analysenmethode war zunächst die Synthese von authentischen Referenzmaterialien von entscheidender Bedeutung. Für mechanistische Aussagen wurden die Inkubationen mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markiertem GA umgesetzt, sowie der Einfluss von nicht-oxidativen Bedingungen auf die Bildung von Pyridinium-AGEs untersucht. Um die Relevanz dieser Strukturklasse im Hinblick auf die photosensibilisierende Generierung von oxidativem Stress zu beurteilen, wurden Bestrahlungsexperimente mit UV-Licht durchgeführt.

Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bezog sich auf die Quantifizierung von posttranslationalen Proteinmodifikationen sowohl in kommerziell erhältlichen Kartoffelchips als auch beim Frittieren von Kartoffelscheiben unter definierten Bedingungen, sowie in gegrillten Rindfleischbratlingen. Gleichzeitig wurden wichtige α -Hydroxycarbonyle während der Prozessierung der Lebensmittel untersucht.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Synthese verschiedener Pyridinium-AGEs

In vivo wurde die endogene Akkumulation von Pyridinium-Proteinmodifikationen im Augenlinsenprotein beobachtet, wobei die Strukturen hier potentiell wichtige Marker für Krankheitsbilder wie z.B. Katarakt darstellen.^{70,161} Des Weiteren konnte diese Strukturklasse in prozessierten Lebensmitteln nachgewiesen werden.¹⁶² Für die Quantifizierung von AGEs in verschiedenen Matrices ist die Herstellung von authentischen Referenzstandards von fundamentaler Bedeutung. Eine Möglichkeit stellt die Isolierung von Pyridinium-AGEs aus kataraktösen Linsen oder aus entsprechenden Modellinkubationen dar. Allerdings erfolgt dies nur in sehr geringen Ausbeuten.^{5,78} Daher wurde in der vorliegenden Arbeit eine Synthesestrategie basierend auf den Untersuchungen von Adamczyk *et al.* entwickelt (Abb. 15).¹⁶³

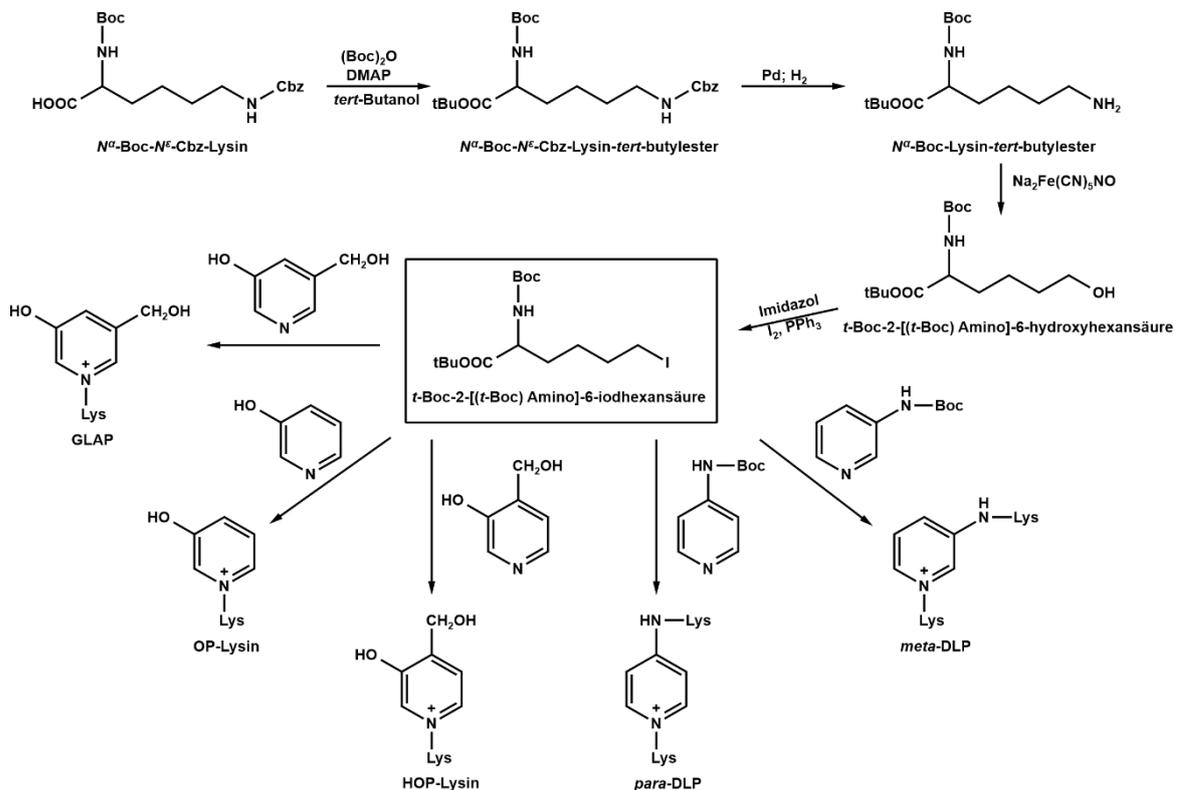


Abb. 15: Überblick Synthesestrategie

Klaus *et al.* konnten in Modellinkubationen mit Ribonuclease A eine neuartige Lysin-Lysin-Crosslink-Struktur (1-(5-Amino-5-carboxypentyl)-4-(5-amino-5-carboxypentyl-amino)-Pyri-

dinium-Salz) identifizieren.⁵² Allerdings beruhte die Strukturaufklärung lediglich auf massenspektrometrischen Untersuchungen. Eine detaillierte Analyse hinsichtlich des Substitutionsmusters erfolgte nicht. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand daher die Synthese der bivalenten Pyridinium-AGEs *para*-Dilysinpyridinium-Salz (*para*-DLP) und *meta*-Dilysinpyridinium-Salz (*meta*-DLP). Des Weiteren wurden die monovalenten Verbindungen 3-Hydroxypyridiniumlysin (OP-Lysin), 3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridiniumlysin (GLAP) und 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridiniumlysin (HOP-Lysin) synthetisiert. Die Synthesestrategie für die Darstellung der Pyridinium-AGEs beruhte auf der Herstellung des entsprechenden Pyridinderivates mit anschließender Quarternisierung des Stickstoffatoms mit einem Alkylhalogenid. Als Alkylierungsmittel diente hierbei *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)Amino]-6-iodhexansäure, welches in einer vierstufigen Synthese hergestellt wurde.

4.1.1 Darstellung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)Amino]-6-iodhexansäure

4.1.1.1 Stufe 1: Einführung einer Boc-Schutzgruppe

Hinsichtlich der Reaktivität der Seitengruppen von Lysin und zur Vermeidung von unerwünschten Nebenreaktionen während der mehrstufigen Synthese wurde im ersten Schritt die Carboxylfunktion des Eduktes mittels einer Schutzgruppe modifiziert. Als Ausgangsprodukt diente *N*^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin (**1**) wobei die *N*^α- und *N*^ε-Aminofunktionen bereits durch eine *tert*-Butyloxycarbonyl- (Boc) und eine Benzyloxycarbonylschutzgruppe (Cbz) geschützt waren. Für die Bildung des sterisch anspruchsvollen *tert*-Butylesters wurde, analog nach Strazzolini *et al.*, Di-*tert*-Butyldicarbonat ((Boc)₂O) mit 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator in *tert*-Butanol umgesetzt (Abb. 16).¹⁶⁴

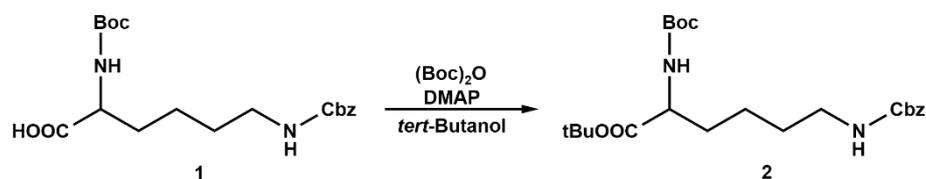


Abb. 16: Darstellung von *N*^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin-*tert*-butylester

4.1.1.2 Stufe 2: Hydrogenolytische Abspaltung der Cbz-Schutzgruppe

Die Verwendung von orthogonalen Schutzgruppen ermöglichte es im zweiten Schritt die Cbz-Schutzgruppe an der *N*^ε-Aminofunktion von *N*^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin-*tert*-butylester (**2**) hydrogenolytisch unter Palladiumkatalyse abzuspalten, während die anderen Schutzgruppen unter diesen Bedingungen stabil waren. Strukturell gesehen handelte es sich hierbei um ein Benzylcarbamat, welches unter milden Bedingungen und unter Freisetzung von

Kohlenstoffdioxid in das korrespondierende primäre Amin gespalten wurde (Abb. 17).¹⁶⁵ Die so freigesetzte *N*^ε-Aminogruppe des *N*^α-Boc-Lysin-*tert*-butylesters (**3**) stand für die nachfolgenden Umsetzungen zur Verfügung.

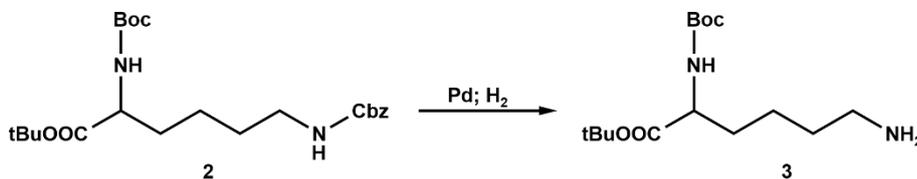


Abb. 17: Darstellung von *N*^α-Boc-Lysin-*tert*-butylester

4.1.1.3 Stufe 3: Diazotierung

Die anschließende Diazotierung des geschützten Lysinderivates mit Natrium-Nitroprussid ($\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$) führte im basischen Milieu zur Bildung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-hydroxyhexansäure (**4**) (Abb. 18). Aufgrund der geringen Löslichkeit von (**3**) in Wasser, begründet durch das Vorhandensein von Schutzgruppen, wurde dieses in einem Wasser-Ethanol-Gemisch gelöst (siehe Kapitel 6.1.3). Die für die Reaktion entscheidenden basischen Bedingungen wurden über die gesamte Reaktionsdauer durch die Zugabe von Natronlauge konstant gehalten. Natrium-Nitroprussid stellt einen oktaedrischen Komplex dar, wobei das kationische Zentralatom (Fe^{2+}) von fünf Cyanid- und einem Nitrosyl-Liganden umgeben ist.¹⁶⁶ Der nucleophile Angriff des primärenamins an den elektrophilen Nitrosyl-Liganden und die darauffolgende Wasserabspaltung führte zunächst zum aliphatischen Diazoniumsalz. In Gegenwart von Hydroxylionen erfolgte ein weiterer nucleophiler Angriff unter Freisetzung von Stickstoff zum korrespondierenden Alkohol.

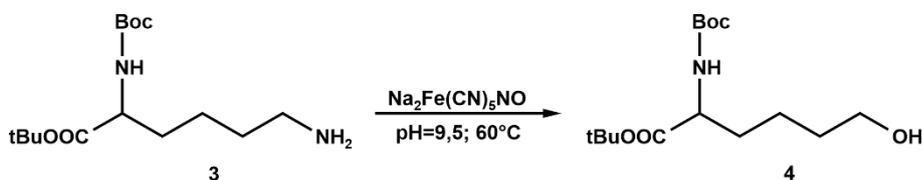


Abb. 18: Darstellung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc) Amino]-6-hydroxyhexansäure

4.1.1.4 Stufe 4: Halogenierung

Im letzten Schritt wurde die Hydroxygruppe mittels Triphenylphosphan (PPh_3), Iod und Imidazol in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) durch Iod substituiert. PPh_3 reagierte zunächst mit Iod zu Iodtriphenylphosphoniumiodid. Dieses Intermediat griff anschließend elektrophil an die Hydroxylfunktion von (**4**) an, wobei schlussendlich *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc) Amino]-6-iodhexansäure (**5**) und Triphenylphosphanoxid resultierten (Abb. 19). Das bei der

Reaktion eingesetzte Imidazol fing entstehenden Iodwasserstoff ab. Die chemische Struktur von (5) wurde mittels ein- und zweidimensionaler Kernresonanzspektroskopie (NMR) identifiziert. Die dazugehörigen Daten sind im Anhang aufgeführt und in guter Übereinstimmung mit den von Adamczyk *et al.* beschriebenen Spektren.¹⁶³ Die Gesamtausbeute der vierstufigen Synthese betrug 10%. (5) diente in den nachfolgenden Umsetzungen als Alkylierungsmittel für die PyridinGrundstrukturen.

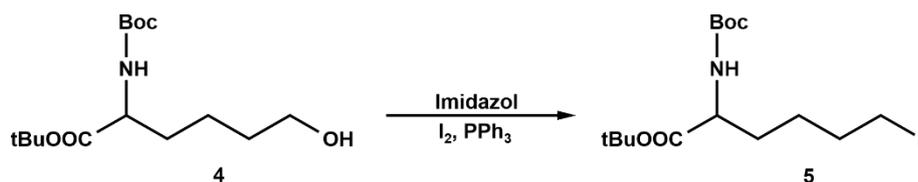


Abb. 19: Darstellung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc) Amino]-6-iodhexansäure

4.1.2 Darstellung von mono- und bivalenten Pyridinium-AGEs

Für die Synthese der bivalenten Pyridinium-AGEs wurde die Alkylierung des PyridinGrundgerüsts zunächst in einer Modellsynthese durchgeführt, wobei Propyliodid als Alkylierungsmittel diente. Die Umsetzung mit 3- bzw. 4-Aminopyridin (3-AP, 4-AP) führte erwartungsgemäß zur Propylierung des endozyklischen N-Atoms. Die primäre Aminofunktion wurde nicht alkyliert.

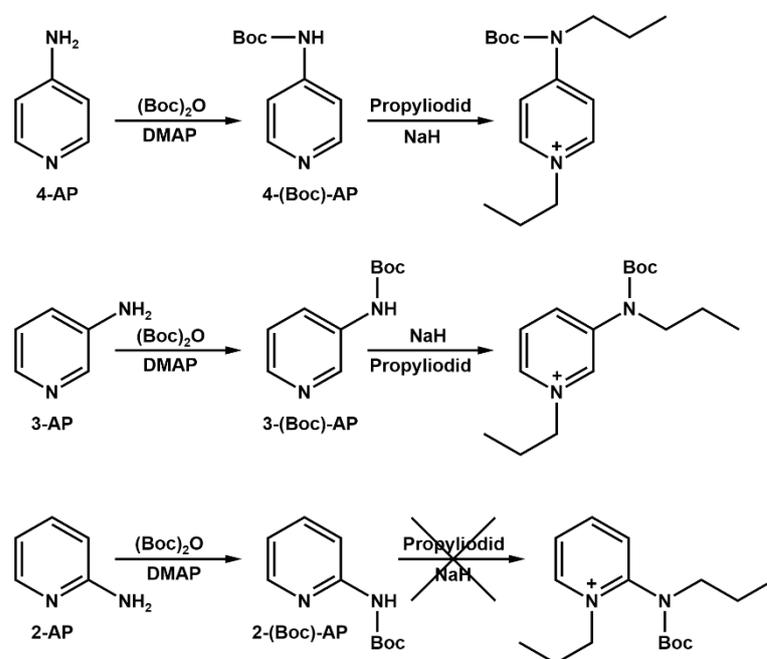


Abb. 20: Modellsynthesen bivalenter Pyridiniumstrukturen

Diese Beobachtung wurde mehrfach in der Literatur beschrieben.^{167,168} Fossey *et al.* untersuchten detailliert die Regioselektivität der Alkylierung von Aminopyridinen und

schlussfolgerten, dass der Angriff des Alkylhalogenids immer am Ionenpaar des endozyklischen N-Atoms erfolgt.¹⁶⁹ Um die Nucleophilie am exocyclischen N-Atom zu erhöhen, wurde die primäre Aminofunktion mit einer Boc-Schutzgruppe geschützt. Die daraus resultierenden sekundären Amine 3-(Boc)-AP und 4-(Boc)-AP führten in der Modellsynthese in Gegenwart von Natriumhydrid zu den gewünschten bialkylierten Strukturen. Zusätzlich wurden analog dazu Untersuchungen mit 2-(Boc)-Aminopyridin durchgeführt, allerdings konnte hier keine Bialkylierung erzielt werden (Abb. 20). Folglich wurde für die Umsetzung mit (5) 3-(Boc)-AP und 4-(Boc)-AP verwendet. Da Natriumhydrid eine starke Base darstellt und (5) unter diesen Bedingungen nicht stabil war, wurde Kaliumcarbonat verwendet (Abb. 21).

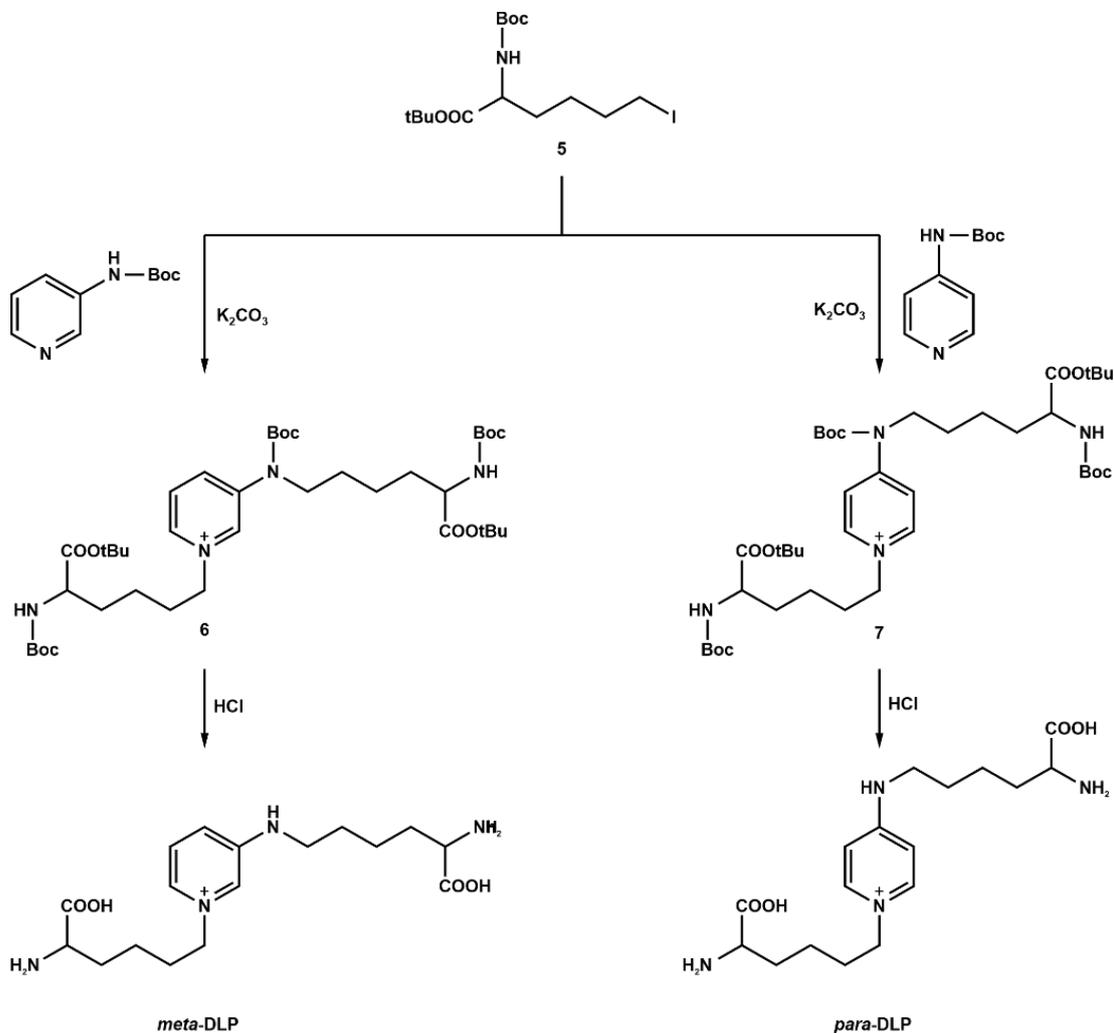


Abb. 21: Darstellung von *meta*- und *para*-DLP

Die synthetisierten bivalenten Pyridinium-AGEs wurden in der geschützten Form (6) und (7) säulenchromatographisch aufgereinigt und anschließend mit 3 N Salzsäure versetzt. Nach Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte die Isolierung von *meta*-DLP und *para*-DLP

mittels präparativer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), wobei Heptafluorbuttersäure (HFBA) als Ionenpaarreagenz diente. Folglich lagen die isolierten Strukturen als HFBA-Salz vor.

Die monovalenten Pyridinium-AGEs wurden nach einem ähnlichen Prinzip synthetisiert (Abb. 22). Als Edukt für OP-Lysin diente 3-Hydroxypyridin (**8**), für die Synthese von GLAP und HOP-Lysin wurden zunächst 5- bzw. 3-Hydroxynicotinsäuremethylester mithilfe von Lithiumaluminiumhydrid zu den korrespondierenden primären Alkoholen (**9** und **10**) reduziert. Die monoalkylierten Verbindungen wurden mittels präparativer HPLC aufgereinigt und lagen, wie zuvor beschrieben, als HFBA-Salz vor. Die chemische Struktur der monovalenten Pyridinium-Aminosäurederivate wurde mittels ^1H - und ^{13}C -NMR sowie mit hochauflösender Massenspektrometrie (HR-MS) bestätigt. Die dazugehörigen Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt und stimmen mit den beschriebenen Daten in der Literatur gut überein.^{4,79,83}

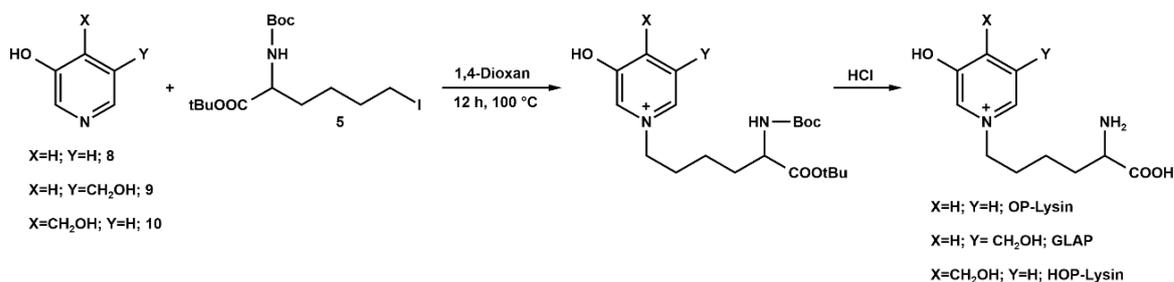


Abb. 22: Darstellung von OP-Lysin, GLAP, HOP-Lysin

4.1.3 Strukturanalyse

Zur Strukturaufklärung beider bivalenten Pyridinium-Aminosäurederivate wurden 1D- NMR- (^1H und ^{13}C -APT (attached proton test)) und 2D-NMR-(homonuclear correlation spectroscopy (H,H COSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC) und heteronuclear multi-bond correlation (HMBC)) Experimente genutzt. Des Weiteren wurde die Authentizität der Standards mit HR-MS bestätigt. In Tab. 4 sind die NMR-Daten und die hochauflösenden Massen zusammengefasst. Das ^1H -NMR-Spektrum von *meta*-DLP zeigte drei im Tieffeld auftretende Signale, welche im üblichen Bereich der chemischen Verschiebung aromatischer Protonen liegen. Die Signale H-2 (7,84 ppm) und H-6 (7,83 ppm) überlagerten sich und waren im Vergleich zu den Protonen H-4 (7,49 ppm) und H-5 (7,53 ppm) aufgrund der Nähe zum positiv geladenen N-Atoms stärker entschirmt und somit signifikant tieffeldverschoben. Die Kopplung zwischen H-6 und H-5 sowie die Kopplung zwischen H-5 und H-4 bewiesen die Substitution der Lysin-Seitenkette in *meta*-Position.

Tab. 4: NMR- und HR-MS-Daten von *para*-DLP und *meta*-DLP in D₂O

<i>para</i> -DLP			<i>meta</i> -DLP		
HR-MS [M] ⁺		353,2183	HR-MS [M] ⁺		353,2183
berechnet C ₁₇ H ₂₉ O ₄ N ₄		353,2189	berechnet C ₁₇ H ₂₉ O ₄ N ₄		353,2189
H/C	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	H/C	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
2	7,92/7,78 (d, 1H) ³ J = 6,9 Hz	143,0/140,7	2	7,84 (s, 1H) ^a	126,4
3	6,70 (d, 2H) ^a ³ J = 6,9 Hz	110,8/105,3	3	-	148,2
4	-	157,1	4	7,49 (d, 1H) ³ J = 6,5 Hz	126,6
5	6,70 (d, 2H) ^a ³ J = 6,9 Hz	110,8/105,3	5	7,53 (dd, 1H) ³ J = 7,1 Hz; 6,5 Hz	127,5
6	7,92/7,78 (d, 1H) ³ J = 6,9 Hz	143,0/140,7	6	7,83 (d, 1H) ^a ³ J = 7,1 Hz	130,9
1'	4,02 (t, 2H) ³ J = 7,2 Hz	57,2	1'	4,43 (t, 2H) ³ J = 7,0 Hz	61,1
2'	1,85 (m, 6H) ^a ³ J = 7,2 Hz	29,3	2'	1,93 (t, 2H) ³ J = 7,0 Hz	29,9
3'	1,37 (m, 4H) ^a	21,0	3'	1,35 (m, 4H) ^a	21,0
4'	1,85 (m, 6H) ^a	29,2	4'	1,84 (m, 4H) ^a	29,4
5'	3,90 (m, 2H) ^a	52,9	5'	3,83 (m, 2H) ^a	53,3
6'	-	172,2	6'	-	172,0
1''	3,23 (t, 2H) ³ J = 7,0 Hz	41,9	1''	3,12 (t, 2H) ³ J = 6,7 Hz	41,9
2''	1,61 (t, 2H) ³ J = 7,0 Hz	27,0	2''	1,59 (t, 2H) ³ J = 6,7 Hz	27,0
3''	1,37 (m, 4H) ^a	21,6	3''	1,35 (m, 4H) ^a	21,7
4''	1,85 (m, 6H) ^a	29,4	4''	1,84 (m, 4H) ^a	29,6
5''	3,90 (m, 2H) ^a	53,0	5''	3,83 (m, 2H) ^a	53,4
6''	-	172,3	6''	-	172,1

^a Signal war überlagert

Die APT-Experimente zeigten eine positive Kohlenstoffresonanz für das quartäre C-3 (148,2 ppm). HMBC-Kopplungen zwischen H-1'' (3,12 ppm) und C-3 sowie zwischen H-1' (4,43 ppm) und C-2 (126,4 ppm) und C-6 (130,9 ppm) stützten das Substitutionsmuster. Das Rückgrat der Lysinseitenketten beider Pyridiniumstrukturen wies nahezu identische Spektren auf, wobei das Proton H-1' eine Ausnahme bildete. Das Signal wurde bei beiden Strukturen in ein Triplet aufgespalten, jedoch unterschiedlich stark tieffeldverschoben (4,43 ppm; *meta*-DLP und 4,02 ppm *para*-DLP). Dies ist durch die mesomeren Grenzstrukturen von *para*-DLP zu erklären. Die Bindung zwischen C-4 und dem exocyclischen N-Atom muss einen Doppelbindungscharakter aufweisen und die Struktur somit als Iminium-Ion vorliegen. Der Vergleich der beiden quartären Kohlenstoffatome [C-3; 148,2 ppm; *meta*-DLP | C-4; 157,1 ppm; *para*-DLP] bestätigten diese Vermutung. Die Bildung einer Iminiumstruktur ist ausschließlich bei *para*-DLP möglich. ^{13}C -NMR-APT-Experimente zeigten, dass sowohl C-2 und C-6 (140,3 ppm/140,7 ppm) als auch C-3 und C-5 (110,8 ppm/105,3 ppm) chemisch nicht äquivalent sind und somit die Isomerisierung zur Pyridiniumstruktur begrenzt ist. Ähnliche Beobachtungen resultierten bei der Untersuchung von 1-Methyl-4-methylaminopyridinium-Salz und Octenidindihydrochlorid.^{170,171} Die hochauflösenden Massen von *meta*-DLP und *para*-DLP waren identisch ($\text{C}_{17}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{N}_4$ $m/z = 353,2183$; theoretisch: 353,2189).

Von beiden Pyridinium-Aminosäurederivaten wurden UV-Spektren (in 0,1 M Phosphatpuffer; pH = 7,4) aufgenommen (Abb. 23). Da *para*-DLP als Iminiumstruktur und *meta*-DLP als Pyridiniumstruktur vorlag, konnten unterschiedliche Absorptionsmaxima verzeichnet werden.

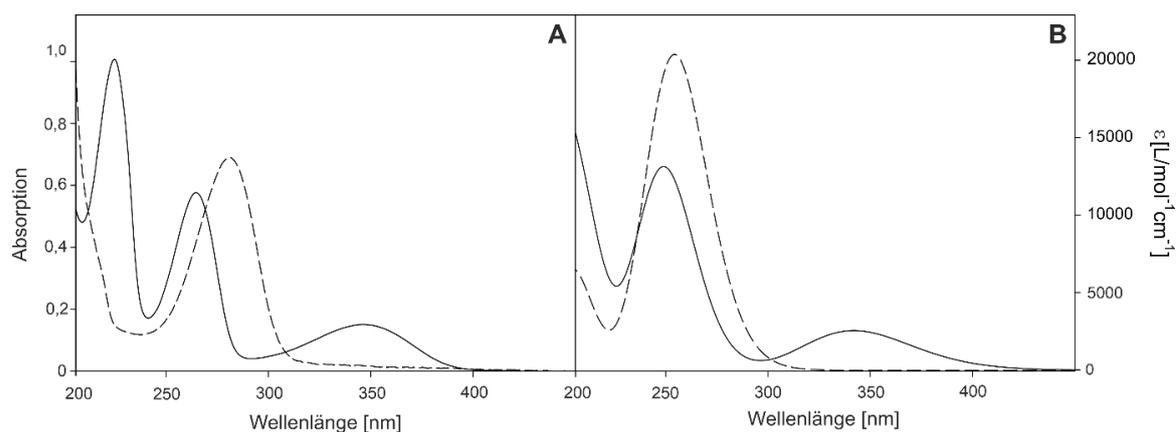


Abb. 23: UV-Spektren von *meta*-DLP (durchgezogene Linie) und *para*-DLP (gestrichelte Linie). (A) in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4 und (B) berechnete Spektren mittels zeitabhängiger Dichtefunktionaltheorie ($\sigma = 0,4$ eV)

Dies konnte außerdem durch die theoretische Berechnung der elektronischen Anregungsenergien mittels zeitabhängiger Dichtefunktionaltheorie (time dependent density

functional theory; TD-DFT) bestätigt werden, wobei die simulierten UV-Spektren eine sehr gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten zeigten. *Meta*-DLP wies zwei Absorptionsmaxima (264 nm und 345 nm) und *para*-DLP lediglich ein Maximum bei 280 nm auf. Die Bestrahlung von *meta*-DLP bei 345 nm resultierte in einem Fluoreszenzpeak bei 435 nm, wobei das Fluoreszenzspektrum pH-Wert unabhängig war (Abb. 24).

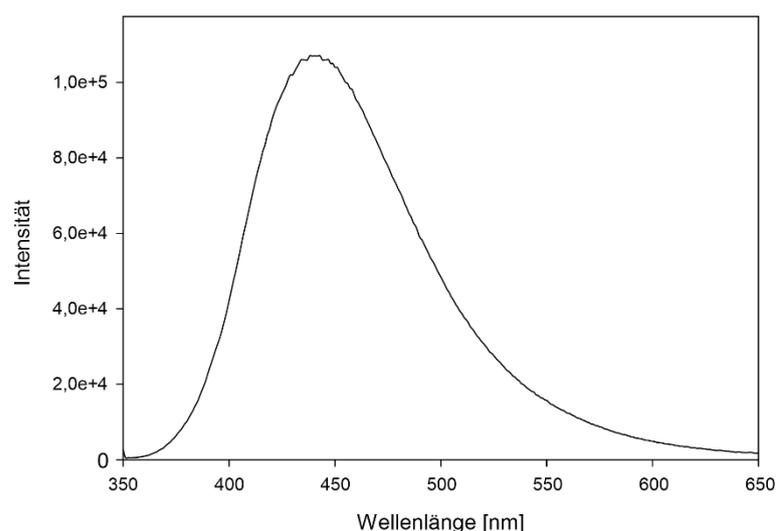


Abb. 24: Emissionsspektrum von *meta*-DLP bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm, pH = 7,4

Im Gegensatz dazu stellte *para*-DLP kein Fluorophor dar. In der Literatur wurden diese unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften aufgrund des Substitutionsmusters bei 3-AP und 4-AP beobachtet. 4-AP zeichnet sich durch eine sehr schwache Fluoreszenz aus, die durch den zweiten angeregten Zustand ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang), welcher einen hohen charge-transfer Charakter besitzt, begründet ist. Der geringste angeregte Zustand ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) findet nur in unpolaren Lösungsmitteln statt. Im Gegensatz dazu ist bei 3-AP der geringste angeregte Zustand in polaren Lösungsmitteln ein $\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang.¹⁷² Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass durch den charge-transfer die Amino-Gruppe in *para*-Position eine Drehung um 90° erfährt (twisted intramolecular charge-transfer).¹⁷³ Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei 4-(Dimethylamino)-Pyridin sowie bei 4-(Dimethylamino)-1-methylpyridinium-Salz gemacht.^{174,175}

Die spektroskopischen Ergebnisse von *meta*-DLP sind in Übereinstimmung mit den Daten eines zuvor isolierten fluoreszierenden Protein-Crosslinks.⁵² Diese Struktur wurde aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Lysin-Lysin-Pyridinium-Dimer (K2P) und aufgrund fehlender NMR-Untersuchungen vorläufig als *para*-DLP beschrieben. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit lässt sich nun eindeutig feststellen, dass es sich bei dem fluoreszierenden

Crosslink um *meta*-DLP handelt. Zugleich stellt dies die beschriebene Struktur von K2P in Frage. Das gelbe Chromophor wurde aus mit Ascorbinsäure modifizierten Kalbslinsen isoliert und charakterisiert, konnte jedoch nur in einigen wenigen Untersuchungen in kataraktösen Linsen quantifiziert werden.^{5,161,176} Obwohl die exocyclische Lysinseitenkette in *para*-Position substituiert ist und K2P ein nicht aromatisches Molekül repräsentiert, ist das beschriebene Absorptionsmaximum (345 nm) und die Fluoreszenzemission (440 nm) fast identisch zu *meta*-DLP. Im Gegensatz zum neuartigen Aminosäure-Crosslink stellt K2P eine säurelabile Struktur dar. K2P müsste unter sauren Bedingungen dehydratisieren und würde dann zum aromatischen, nicht fluoreszierenden und säurestabilen *para*-DLP reagieren. Die Analyse der folgenden Modelluntersuchungen (Kapitel 4.2) sowie der enzymatischen Hydrolyse (Kapitel 4.4.1) sollen diese Fragestellung klären.

Die monovalenten Pyridinium-AGEs OP-Lysin, GLAP und HOP-Lysin zeigten in wässrigen Lösungen eine pH-Wert abhängige Absorption und Fluoreszenz. Je niedriger der pH-Wert, desto stärker verschob sich die Absorption in den kurzwelligen blauen Bereich des Spektrums. In Abb. 25 sind die Ergebnisse für OP-Lysin dargestellt. Unter physiologischen Bedingungen (0,1 M Phosphatpuffer, pH = 7,4) liegt die OH-Gruppe des Pyridinium-Ringes deprotoniert und unter sauren Bedingungen (0,1% Trifluoressigsäure, pH = 2,0) protoniert vor.

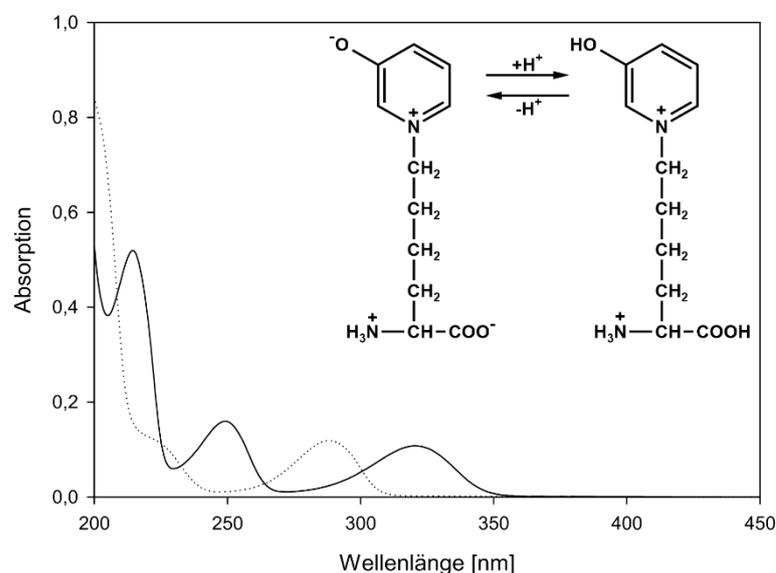


Abb. 25: UV-Spektrum von OP-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 (durchgezogene Linie) und in 0,1% Trifluoressigsäure, pH 2,0 (gestrichelte Linie)

Die Absorptionsmaxima von OP-Lysin lagen bei einem pH = 2,0 bei 223 nm und 288 nm. Die deprotonierte Form wies drei Absorptionsmaxima (214 nm, 249 nm und 320 nm) auf. Infolgedessen waren die Anregungswellenlängen für das Fluoreszenzspektrum von OP-Lysin pH-abhängig. Unter sauren Bedingungen führte eine Bestrahlung bei 288 nm zu einer Emission

bei 391 nm. Die deprotonierte Form wurde bei 320 nm angeregt und ergab ein ähnliches Emissionsspektrum wie das protonierte Molekül mit einem Maximum bei 390 nm. Die erhaltenen Ergebnisse sind im Einklang mit den beschriebenen Daten in der Literatur.⁴ Die Spektren für GLAP und HOP-Lysin sind im Anhang dargestellt.

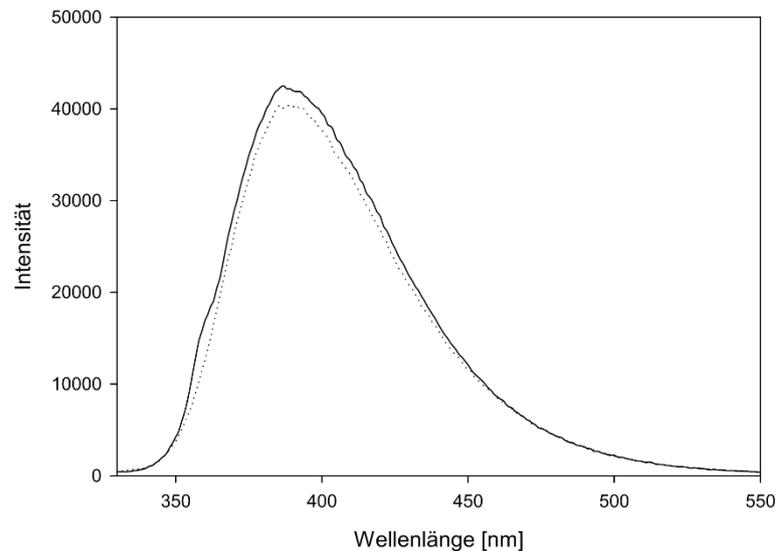


Abb. 26: Emissionsspektrum von OP-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 (durchgezogene Linie), Anregungswellenlänge von 288 nm und in 0,1% Trifluoressigsäure, pH 2,0 (gestrichelte Linie), Anregungswellenlänge von 320 nm

4.1.4 Stabilität

Nach erfolgter Strukturanalyse wurden alle synthetisierten Pyridinium-AGEs hinsichtlich ihrer Stabilität unter stark sauren Bedingungen untersucht. Dazu wurden diese mit 6 N Salzsäure versetzt und für 24 h bei 110 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach flüssigchromatographischer Auftrennung und Nachsäulenderivatisierung mit einem Fluoreszenzdetektor (FLD). Die Derivatisierung mit *o*-Phthaldialdehyd (OPA) war erforderlich, da *para*-DLP keine Eigenfluoreszenz besitzt. Primäre Amine und OPA werden in Gegenwart eines Thiols, wie z.B. 2-Mercaptoethanol, zu einem fluoreszierenden Isoindol umgesetzt. Infolgedessen besaßen alle Analyten dieselbe Anregungswellenlänge (340 nm) und Emissionswellenlänge (455 nm). Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Kalibrierung. Für die monovalenten Pyridinium-AGEs konnte eine HPLC-Methode entwickelt werden, bei der alle drei Analyten basisliniengetreunt vorlagen (Abb. 27). Nach erfolgter Reaktionszeit wurden nahezu identische Gehalte von OP-Lysin, GLAP und HOP-Lysin detektiert.

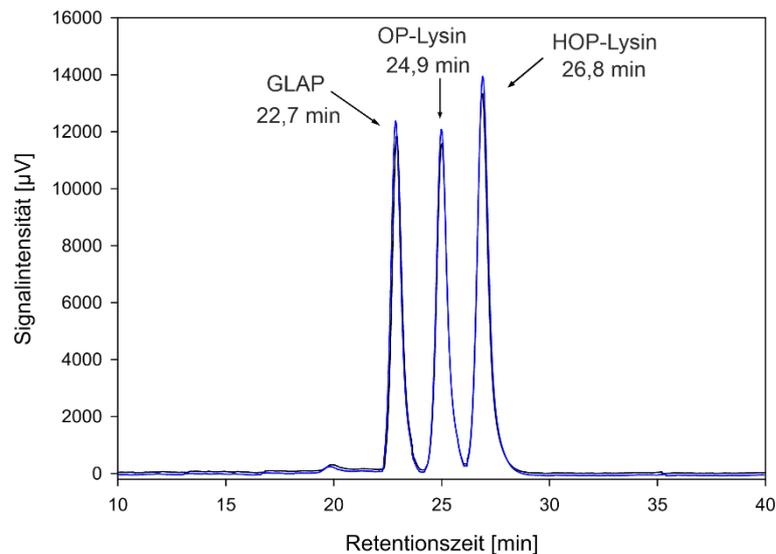


Abb. 27: HPLC-FLD Chromatogramm der synthetisierten monovalenten Pyridinium-AGEs vor (schwarze Linie) und nach 24-stündiger saurer Hydrolyse (blaue Linie)

Für *meta*-DLP und *para*-DLP konnte ebenfalls eine Methode entwickelt werden, die zur Auftrennung der beiden Strukturen führte. Beide Aminosäurederivate zeigten nach der sauren Hydrolyse unveränderte Gehalte (Abb. 28). Somit kann ein Abbau der hier synthetisierten Pyridinium-AGEs unter sauren Bedingungen ausgeschlossen werden.

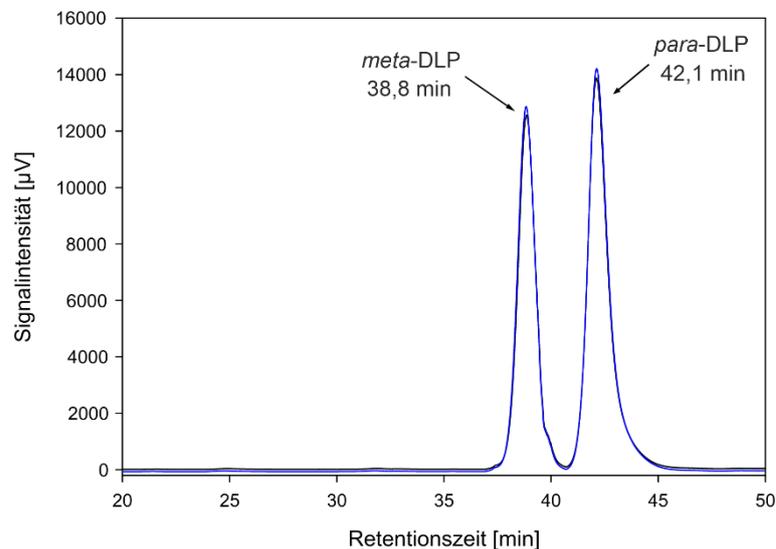


Abb. 28: HPLC-FLD Chromatogramm der synthetisierten bivalenten Pyridinium-AGEs vor (schwarze Linie) und nach 24-stündiger saurer Hydrolyse (blaue Linie)

4.1.5 Entwicklung einer MRM-Methode

Für die Entwicklung einer sensitiven Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Methode wurde für jede Struktur eine Massenkalisierung („Tuning“) am Massenspektrometer durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Quellenparameter auf die Zielanalyten so eingestellt, dass die

Ionisations- und Fragmentierungseffizienz maximal war. Für das „Tuning“ wurden die synthetisierten Pyridinium-AGEs in einer Konzentration von 10 ng/mL in Reinstwasser gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die Injektion der jeweiligen Lösungen mit Hilfe der Spritzenpumpe des Massenspektrometers bei einem Fluss von 20 μ L/min. Als erstes erfolgte die Bestimmung der Muttermasse der Analyten. Danach wurde für jede einzelne Struktur das optimale „Declustering Potential“ (DP) und die dazugehörigen Produktionen bestimmt. Daraufhin wurden für alle Massenpaare die Kollisionsenergien (CE) sowie die Zellaustrittspotentiale (CXP) optimiert. Die ermittelten Daten sind in Tab. 5 zusammengefasst. Die anschließende Kopplung mit einer geeigneten HPLC-Methode ist im Anhang ausführlich beschrieben.

Tab. 5: MS/MS-Übergänge der synthetisierten Standards

Analyt	Retentionszeit [min]	Molekülion [Da]	Massenfragment [Da]	DP [V]	CE [eV]	CXP [V]
GLAP	22,7	255,2	210,0	75,0	27,0	14,0
			130,1		23,0	10,0
			126,2		25,0	9,0
			84,1		35,0	14,0
OP-Lysin	23,0	225,1	180,1	60,0	25,0	12,0
			129,8		21,0	11,0
			96,3		27,0	9,0
			84,1		31,0	12,0
HOP-Lysin	23,3	255,2	210,2	75,0	25,0	12,0
			130,0		22,0	15,0
			126,2		27,0	9,0
			84,1		40,0	16,0
<i>meta</i> -DLP	29,8	353,2	308,2	75,0	30,0	15,0
			224,2		34,0	20,0
			130,2		45,0	9,5
			84,1		51,0	6,0
<i>para</i> -DLP	30,2	353,2	308,2	75,0	30,0	15,0
			224,2		32,0	20,0
			130,2		40,0	20,0
			84,1		60,0	17,0

4.2 Modelluntersuchungen zur Bildung von Pyridinium-AGEs

Damit die Strukturen sicher in den folgenden Modelluntersuchungen quantifiziert werden konnten, war die Bestimmung von Nachweisgrenze (NWG) und Bestimmungsgrenze (BG) der Verbindungen in den Modellinkubationen unerlässlich. Die NWG beschreibt die kleinste noch nachweisbare Menge an Analyt, während unter der BG die geringste noch quantifizierbare Menge verstanden wird. Dabei ist die NWG als dreifache und die BG als zehnfache Rauschhöhe zur Retentionszeit der Verbindung definiert. Die ermittelten NWG und BG der einzelnen Analyten sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: NWG und BG von AGEs in Modellinkubationen

Analyt	BG [$\mu\text{mol/mol}$ Lysin]	NWG [$\mu\text{mol/mol}$ Lysin]
CML	0,53	1,58
HEL	0,08	0,23
GLAP	0,06	0,18
HOP-Lysin	0,06	0,19
<i>meta</i> -DLP	0,04	0,13
OP-Lysin	0,07	0,20

4.2.1 Kurzkettige Carbonylverbindungen

Kurzkettige α -Hydroxycarbonyle wie Glyceraldehyd (G3) und Glycolaldehyd (GA) sind bekannt als potente Glykierungsagenzien und spielen eine wichtige Rolle für die Entstehung von Pyridinium-AGEs.^{4,78,82} In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative Bildung von *meta*-DLP, OP-Lysin, GLAP und HOP-Lysin in verschiedenen Modellinkubationen näher untersucht. Dazu wurden reaktive Carbonylstrukturen mit *N*^o-*tert*-Boc-Lysin unter milden Bedingungen (pH 7,4; 37 °C) für sieben Tage inkubiert. Eine detaillierte Erläuterung der Inkubationen ist in Kapitel 6.2 und 6.3 beschrieben. Da GA in Gegenwart von Lysin leicht zu Glyoxal (GX) oxidiert wird, wurden neben aeroben Inkubationen zudem Inkubationen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt.⁵⁶ Um beurteilen zu können, ob die anaeroben Inkubationen erfolgreich unter Sauerstoffausschluss abgelaufen sind, wurde in allen Inkubationen *N*⁶-Carboxymethyllysin (CML) quantifiziert. CML stellt ein GX-spezifisches AGE dar und benötigt für die Bildung in der anaeroben GA-Inkubation einen zusätzlichen Oxidationsschritt.³⁰ Erwartungsgemäß wurden unter oxidativen Bedingungen signifikant höhere Gehalte CML detektiert. Nichtsdestotrotz konnte die Bildung von CML in anaeroben

GA-Inkubationen beobachtet werden, was darauf hinweist, dass ein geringer Teil von GA zu GX oxidiert worden ist (Tab. 7). Die bestimmten Konzentrationen der GX-spezifischen Proteinmodifikation sind im Einklang mit den Daten in der Literatur.⁵⁶ Die Vorläuferstrukturen der monovalenten Pyridinium-AGEs sind in der Literatur beschrieben, jedoch wurden für die Bildung der Lysinmodifikationen lediglich relative Mengen angegeben.⁸³ In der vorliegenden Arbeit wurde die höchste Konzentration von HOP-Lysin in der anaeroben GA-Inkubation (214 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin) detektiert, die Mischinkubation GA/G3 (äquimolare Mengen) ergab 28,6 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin. In den jeweiligen aeroben Inkubationen wurden zweifach geringere Mengen gebildet. Dies unterstreicht die Bedeutung von GA für die Bildung von HOP-Lysin. GLAP wurde in G3- und GA/G3-Inkubationen detektiert, wobei die höchsten Gehalte in der G3-Inkubation nachgewiesen wurden. Weiterhin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen festgestellt werden. Obwohl GLAP und HOP-Lysin Konstitutionsisomere darstellen, werden diese durch unterschiedliche Carbonyle gebildet. Einzelinkubationen mit GX oder Methylglyoxal (MGX) führten nicht zur Bildung der Pyridinium-Proteinmodifikationen. Basierend auf den Ergebnissen der Modellinkubationen konnte HOP-Lysin als GA-spezifisches und GLAP als G3-spezifisches AGE bestätigt werden.

Tab. 7: Bildung von CML, HOP-Lysin, GLAP, meta-DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit *N*^α-tert-Boc-Lysin und kurzketigen Carbonylen nach sieben Tagen (pH 7,4) unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Inkubation	CML	OP-Lysin	meta-DLP	GLAP	HOP-Lysin
	[mmol/mol Lysin]	[$\mu\text{mol/mol}$ Lysin]			
GA (aerob)	37,2 \pm 1,5	11,6 \pm 0,6	1,23 \pm 0,10	< BG	116 \pm 10
GA (anaerob)	5,2 \pm 0,2	25,2 \pm 2,0	1,32 \pm 0,12	< BG	214 \pm 15
GA/G3 (aerob)	16,5 \pm 0,9	10,6 \pm 0,8	4,12 \pm 0,34	7,9 \pm 0,6	16,4 \pm 1,2
GA/G3 (anaerob)	2,3 \pm 0,1	13,9 \pm 1,2	4,42 \pm 0,41	8,3 \pm 0,7	28,6 \pm 2,2
G3 (aerob)	< BG	< BG	< BG	39,0 \pm 2,1	< BG
G3 (anaerob)	< BG	< BG	< BG	40,2 \pm 3,8	< BG
GX (aerob)	43,0 \pm 1,2	< BG	< BG	< BG	< BG
GX (anaerob)	42,6 \pm 1,1	< BG	< BG	< BG	< BG
MGX (aerob)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG
MGX (anaerob)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Meta-DLP konnte in allen GA- und GA/G3-Inkubationen detektiert werden, wobei in der GA/G3-Mischinkubation im Vergleich zur GA-Inkubation dreifach höhere Mengen nachgewiesen wurden. Dies scheint auf den ersten Blick offensichtlich zu sein, da das

Pyridinium-Grundgerüst von *meta*-DLP fünf Kohlenstoffatome besitzt und diese durch die Kombination beider α -Hydroxycarbonyle zu Verfügung stehen. Einzelinkubationen mit GX, MGX oder G3 führten nicht zur Bildung von *meta*-DLP oder OP-Lysin. Gegenüber CML konnte bei *meta*-DLP ein Trend, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen aeroben und anaeroben Inkubationen festgestellt werden. Da die Quantifizierung der Proteinmodifikationen nach der sauren Abspaltung der Boc-Schutzgruppe von *N* ^{α} -*tert*-Boc-Lysin erfolgte, müsste unter diesen Bedingungen demzufolge vorhandenes K2P zu *para*-DLP reagieren. Allerdings konnte in keiner Modellinkubation *para*-DLP detektiert werden, was die Bildung von K2P durch GA, GX, G3 und MGX ausschließt.

Tab. 8: Bildung von CML, *meta*-DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit *N* ^{α} -*tert*-Boc-Lysin und verschiedenen Verhältnissen GA/GX nach sieben Tagen (pH 7,4) unter anaeroben Bedingungen

Inkubation	CML	OP-Lysin	<i>meta</i> -DLP
	[mmol/mol Lysin]	[μ mol/mol Lysin]	
GA/GX (9:1) (anaerob)	35,4 \pm 1,1	23,6 \pm 2,0	1,94 \pm 0,18
GA/GX (3:1) (anaerob)	36,7 \pm 1,3	18,2 \pm 1,0	2,04 \pm 0,18
GA/GX (1:1) (anaerob)	38,0 \pm 1,1	14,1 \pm 1,0	2,32 \pm 0,20
GA/GX (1:3) (anaerob)	39,4 \pm 1,2	12,8 \pm 1,0	2,34 \pm 0,21
GA/GX (1:9) (anaerob)	41,5 \pm 1,1	5,4 \pm 0,2	0,64 \pm 0,04

Im Gegensatz zur Literatur wurden die höchsten Konzentrationen von OP-Lysin (25,2 μ mol/mol Lysin) in der anaeroben GA-Inkubation detektiert. Argirov *et al.* konnten die Proteinmodifikation ausschließlich in GA/G3-Mischinkubationen nachweisen.⁴ Dieses Ergebnis wies auf einen bedeutenden alternativen Bildungsmechanismus hin. Da in den anaeroben Inkubationen ein geringer Teil von GA zu GX oxidiert wurde, musste die α -Dicarbonylstruktur an der Bildung von OP-Lysin bzw. *meta*-DLP beteiligt sein. Daher wurden Modellinkubationen unter nicht oxidativen Bedingungen mit unterschiedlichen Verhältnissen GA/GX untersucht. Die Bildung von *meta*-DLP erreichte ein Maximum bei einem Verhältnis GA/GX (1:3) während OP-Lysin mit steigender GX-Konzentration kontinuierlich abnahm (Tab. 8). Dies zeigte eindeutig, dass GX in Gegenwart von GA eine Vorläuferstruktur für beide Pyridiniumstrukturen ist. Anschließende Modellinkubationen von 1-¹³C-Glycolaldehyd (1-¹³C-GA) und GX in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen mit *N* ^{α} -*tert*-Boc-Lysin unter nicht-oxidativen Bedingungen bestätigten diese Vermutung.

Abb. 29 zeigt den Einfluss von GX auf das Isotopenverhältnis von *meta*-DLP und OP-Lysin. Die Einzelinkubation mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -GA führte zu zweifach (m/z 355 bzw. 227) und dreifach (m/z 356 bzw. 228) markierten Strukturen. Die Detektion von dreifach markierten Strukturen bewies, dass drei Moleküle GA für die Bildung des Pyridinium-Grundgerüsts benötigt werden und folglich ein C_1 -Fragment abgespalten werden muss. Das nahezu gleiche Verhältnis zwischen zweifacher und dreifacher Markierung ist auf die aminkatalysierte Tautomerie von GA zurückzuführen. Mit steigender GX-Konzentration nahm die Dreifachmarkierung deutlich ab und wurde bei einem Verhältnis von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -GA/GX (1:9) vernachlässigbar. Dies ist darauf zurückzuführen, dass unmarkiertes GX in das Pyridinium-Grundgerüst eingebaut wurde.

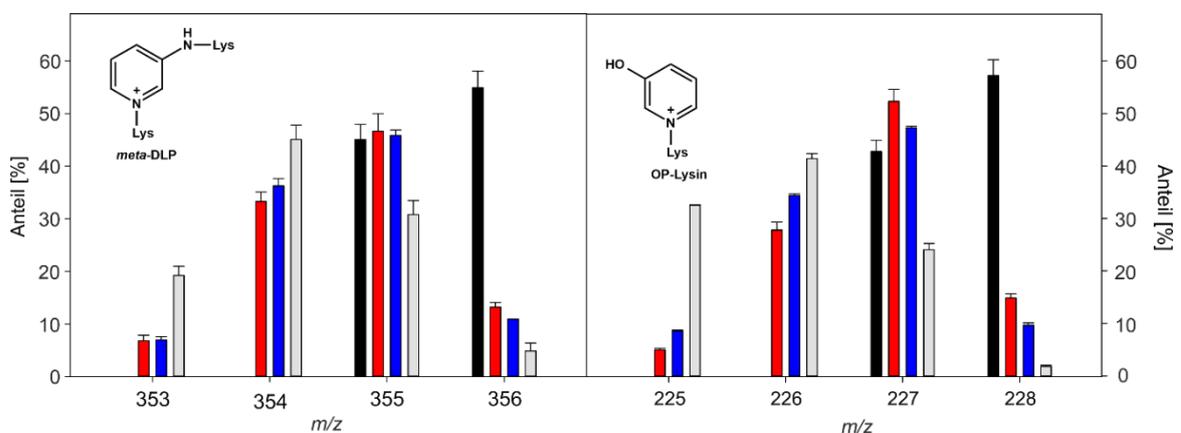


Abb. 29: Einfluss von GX auf das Isotopenverhältnis von (A) *meta*-DLP und (B) OP-Lysin in Modellinkubationen mit N^{α} -*tert*-Boc-Lysin und verschiedenen Konzentrationen von $1\text{-}^{13}\text{C}$ -GA und GX (schwarze Balken, 40 mM/0 mM); rote Balken, 35,6 mM/4,4 mM; blaue Balken, 20 mM/20 mM; graue Balken, 4,6 mM/35,6 mM)

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich ein neuer alternativer Bildungsweg für *meta*-DLP und OP-Lysin unter Beteiligung von einem Molekül GX und zwei Molekülen GA formulieren (Abb. 30). Im ersten Schritt reagiert die ϵ -Aminofunktion von Lysin mit zwei Molekülen GA zum Di-Amadori-Produkt. Der darauffolgende Angriff von Glyoxal und Wasser führt zu einem Hydrat, welches in einem aldolähnlichen Cyclisierungsschritt unter Abspaltung eines C_1 -Fragmentes in Form von Ameisensäure zum Pyridinium-Ring reagiert. Für die Bildung von *meta*-DLP erfolgt ein weiterer nucleophiler Angriff von Lysin. Diese Art der Disproportionierungsreaktion einschließlich der Abspaltung von Ameisensäure wurde bereits für die Bildung von GOLD beschrieben.⁵⁸

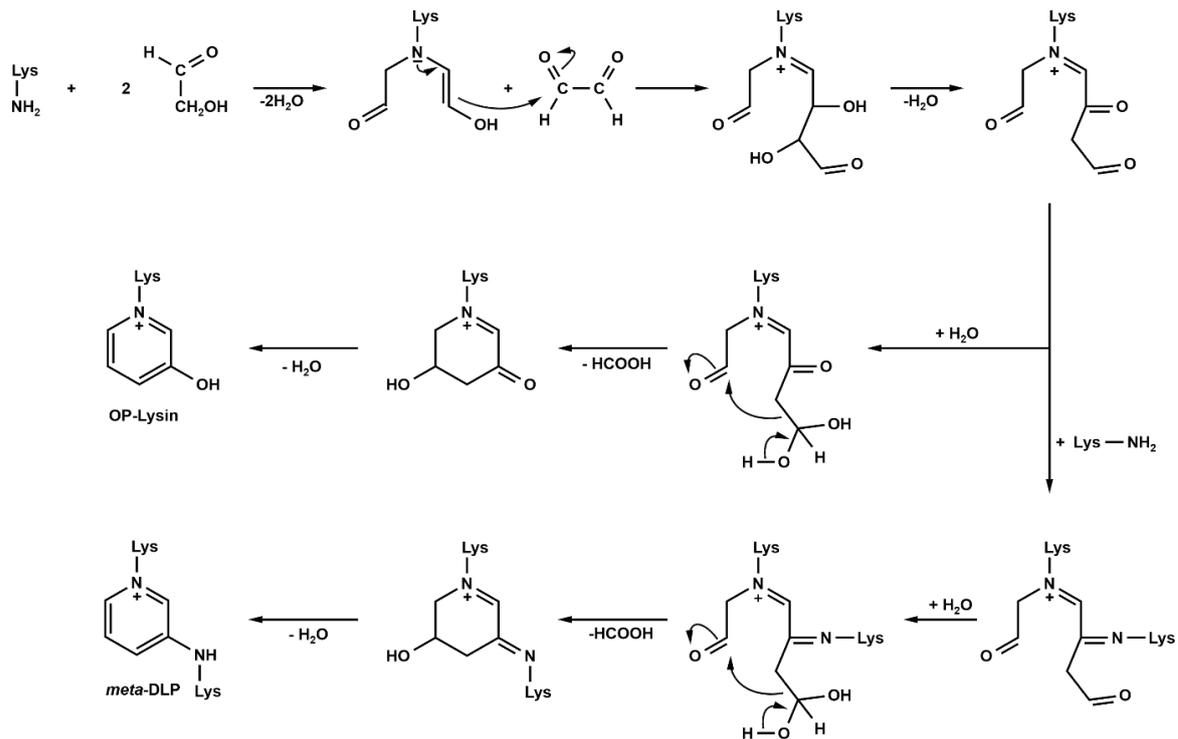


Abb. 30: Alternativer Reaktionsmechanismus für die Bildung von *meta*-DLP und OP-Lysin

4.2.2 Höherkettige Zucker

Reduzierende Kohlenhydrate mit längerem Kohlenstoff-Rückgrat repräsentieren im Hinblick auf die Maillard-induzierte Fragmentierung und die daraus resultierenden kurzkettigen Carbonylstrukturen potentielle Vorläuferstrukturen für Pyridinium-AGEs. In diesem Zusammenhang wurden Kohlenhydrate mit einem C₄-, C₅- und C₆-Grundgerüst unter oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen mit *N*^ε-*tert*-Boc-Lysin für sieben Tage inkubiert. Im Gegensatz zur Literatur konnte OP-Lysin in allen Zuckerinkubationen mit Ausnahme der Glucose-Inkubation detektiert werden (Tab. 9). Argirov *et al.* nutzen UV- und fluoreszenzspektroskopische Methoden, wohingegen hier eine hochsensitive LC-MS/MS Methode für die Detektion der AGEs verwendet wurde.⁴ Reaktionsgemische unter Sauerstoffausschluss bildeten signifikant höhere Mengen OP-Lysin, *meta*-DLP und HOP-Lysin und verdeutlichten, dass GA in diesen Inkubationen eine wichtige Vorläuferstruktur darstellt. Dagegen wurde CML in signifikant höheren Mengen in aeroben Inkubationen quantifiziert, wobei hier die GX-vermittelte Isomerisierung und die oxidative Fragmentierung des Amadori-Produktes die vorherrschenden Bildungswege waren. GLAP konnte ausschließlich in Ribose-Inkubationen quantifiziert werden. Reaktionsgemische mit C₄-Zuckern bildeten HOP-Lysin in vergleichbaren Mengen wie GA-Inkubationen. Dies bestätigte die Untersuchungen von Argirov *et al.* und zeigte, dass L-Erythrose, D-Threose und D-Erythrose direkte Präkursorstrukturen für HOP-Lysin darstellen.⁸³ Im Gegensatz dazu wurden geringere

Konzentrationen *meta*-DLP (0,82 und 0,26 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin) in allen C_5 -Zucker-Inkubationen im Vergleich zur GA/G3-Mischinkubation detektiert. Somit konnten C_5 -Präkursoren als geeignetere mechanistische Edukte für die Bildung von *meta*-DLP ausgeschlossen werden. Des Weiteren stellt Ascorbinsäure (ASC), vorwiegend die oxidierte Form Dehydroascorbinsäure (DHA), ein potentes Glykierungsmittel *in vivo* und *in vitro* dar.^{177,178} Daher wurde ASC unter oxidativen und nicht-oxidativen Bedingungen mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin für sieben Tage inkubiert. Aus Tab. 9 geht hervor, dass alle monovalenten Pyridinium-AGEs in der aeroben Inkubation detektiert werden konnten, die gebildeten Mengen von *meta*-DLP konnten nicht quantifiziert werden. Obwohl ASC als eine direkte Vorläuferstruktur für K2P beschrieben wird, konnte in keiner Inkubation *para*-DLP nachgewiesen werden.

Tab. 9: Bildung von CML, HOP-Lysin, GLAP, *meta*-DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin und verschiedenen Zuckern nach sieben Tagen (pH 7,4) unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Inkubation	CML	OP-Lysin	<i>meta</i> -DLP	GLAP	HOP-Lysin
	[mmol/mol Lysin]	[$\mu\text{mol/mol}$ Lysin]			
D-Glucose (aerob)	1,3 ± 0,1	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
D-Glucose (anaerob)	0,17 ± 0,10	< NWG	< NWG	< NWG	< NWG
D-Ribose (aerob)	54,5 ± 1,6	4,01 ± 0,21	0,33 ± 0,02	0,12 ± 0,01	2,38 ± 0,20
D-Ribose (anaerob)	14,6 ± 0,8	23,9 ± 1,3	0,82 ± 0,07	0,14 ± 0,01	14,3 ± 1,1
L-Arabinose (aerob)	26,0 ± 0,7	1,02 ± 0,10	0,15 ± 0,01	< NWG	0,11 ± 0,01
L-Arabinose (anaerob)	6,8 ± 0,2	1,62 ± 0,07	0,26 ± 0,02	< NWG	0,39 ± 0,03
D-Xylose (aerob)	25,0 ± 0,7	1,17 ± 0,11	0,17 ± 0,01	< NWG	0,13 ± 0,01
D-Xylose (anaerob)	7,2 ± 0,3	1,65 ± 0,06	0,27 ± 0,02	< NWG	0,39 ± 0,03
D-Threose (aerob)	11,2 ± 0,5	0,62 ± 0,05	< NWG	< NWG	73 ± 3
D-Threose (anaerob)	6,3 ± 0,3	0,83 ± 0,03	< NWG	< NWG	140 ± 9
D-Erythrose (aerob)	12,2 ± 0,5	0,45 ± 0,04	< NWG	< NWG	20 ± 1
D-Erythrose (anaerob)	6,3 ± 0,3	0,72 ± 0,04	< NWG	< NWG	41 ± 2
L-Erythrulose (aerob)	9,9 ± 0,4	0,49 ± 0,04	< NWG	< NWG	75 ± 3
L-Erythrulose (anaerob)	7,2 ± 0,4	0,62 ± 0,03	< NWG	< NWG	139 ± 9
ASC (aerob)	7,5 ± 0,5	0,31 ± 0,02	< NWG	0,14 ± 0,01	3,57 ± 0,30
ASC (anaerob)	< BG	< BG	< BG	< BG	< BG

Im Vergleich zu OP-Lysin (0,31 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin) wurde HOP-Lysin (3,57 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin) in zehnfach höheren Mengen gebildet. Dies ist auf die Fragmentierung von DHA zu Erythrose zurückzuführen.⁸⁷

Interessanterweise waren die gebildeten Mengen von OP-Lysin durch Ribose unter nicht-oxidativen Bedingungen in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie in den GA-Inkubationen. Um genauere mechanistische Einblicke in die Fragmentierung von Ribose und das daraus resultierende Redoxsystem GA/GX zu erhalten, wurde die Pentose über einen Zeitraum von 168 h mit *N* ^{α} -*tert*-Boc-Lysin unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen inkubiert. Die Differenzierung zwischen GA und GX erfolgte anhand einer etablierten Methode von Henning *et al.*⁵⁶ Hierbei reagieren die freien Carbonyle mit der ϵ -Aminofunktion von *N* ^{α} -*tert*-Boc-Lysin zunächst zu den korrespondierenden Iminen. Die anschließende Reduktion mit Natriumbordeuterid (NaBD₄) führt zu stabilen Produkten (Abb. 31). Das GA-Imin reagiert zum einfach deuterierten *N* ^{ϵ} -(2-Hydroxy-1-d-ethyl)-Lysin (HEL-1D) und das GX-Imin zum zweifach deuterierten *N* ^{ϵ} -(2-Hydroxy-1,2-d-ethyl)-Lysin (HEL-2D).

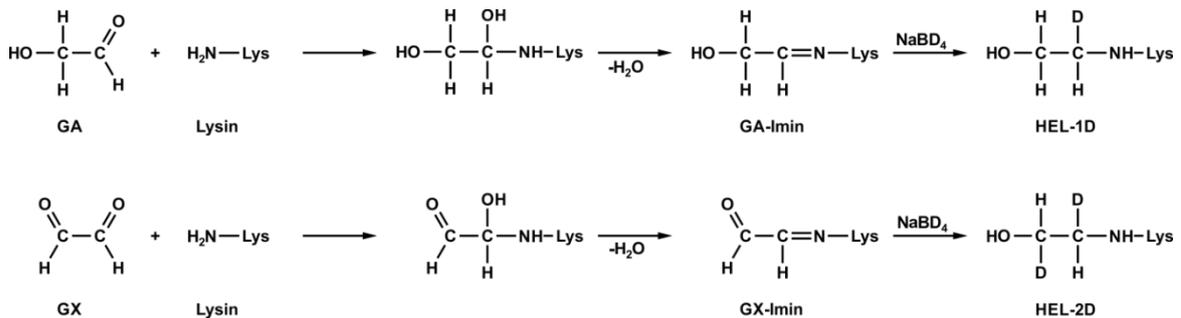


Abb. 31: Reaktionsweg von GA und GX zur Bildung von HEL-1D und HEL-2D

Abb. 32 zeigt die zeitabhängige Bildung der gesamten HEL-Konzentration (Summe von HEL-1D und HEL-2D). In Anwesenheit von Sauerstoff erreichte diese ein Maximum nach 24 h, wohingegen unter anaeroben Bedingungen eine kontinuierliche Bildung beobachtet werden konnte. Dennoch war die HEL-Konzentration zu jedem gemessenen Zeitpunkt in den aeroben Inkubationen höher. HEL-1D, dargestellt als prozentualer Anteil am gesamten HEL, erreichte in Abwesenheit von Sauerstoff nach 5 h 73% und sank fortlaufend auf 43%. Unter oxidativen Bedingungen war die Bildung von HEL-1D deutlich geringer und nach 72 h konnte ein Gleichgewicht zwischen GA- und GX-Iminen (28%/72%) festgestellt werden. In Anwesenheit von Aminen reagiert GA über ein 1,4-Dialkylpyrazinium Radikalkation, einschließlich eines Oxidationsschrittes, zu GX.²⁹ Die Bedeutung dieses radikalischen Intermediates wurde im Hinblick auf die Bildung von Bräunungsstrukturen im Rahmen der Maillard-Reaktion bestätigt.²⁸ Zudem konnte gezeigt werden, dass das 1,4-Dialkylpyrazinium

Radikalkation eine Vorläuferstruktur für CML darstellt, wobei für die Entstehung des radikalischen Intermediates ein Oxidationsschritt essentiell ist.⁵⁶

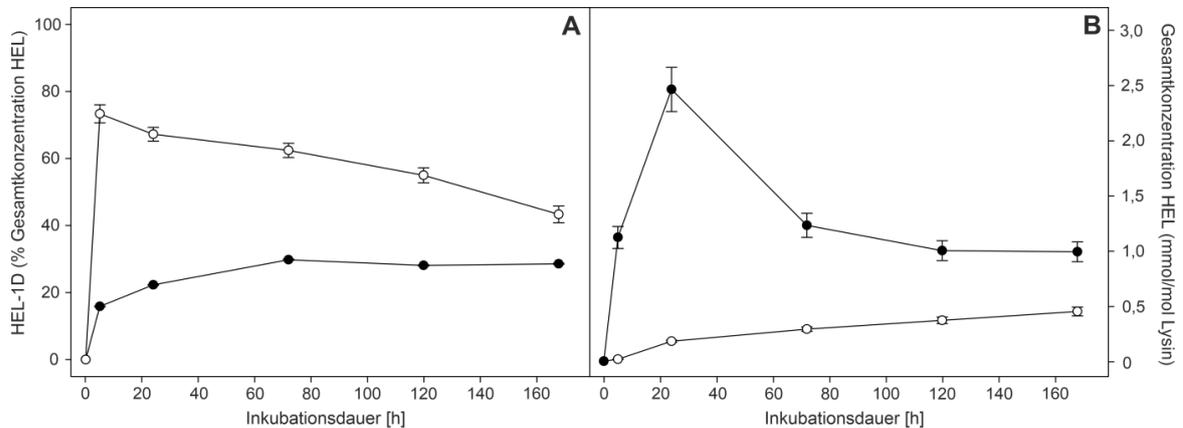


Abb. 32: *N*^α-Boc-Lysin Inkubationen mit Ribose bei 37 °C und pH 7,4 unter oxidativen (geschlossene Symbole) und nicht-oxidativen (offene Symbole) Bedingungen. (A) Bildung von HEL-1D relativ zur Gesamtkonzentration von HEL; (B) absoluter Gehalt von HEL (Gesamtkonzentration HEL, Summe aus HEL-1D und HEL-2D).

Dies bestätigte sich auch in diesen Untersuchungen, da das Verhältnis unter anaeroben Bedingungen deutlich zugunsten von GA lag. Allerdings konnten in aeroben Inkubationen höhere absolute Mengen von GA detektiert werden. Auf der anderen Seite war die Bildung von Pyridinium-AGEs unter anaeroben Bedingungen bis zu sechsmal höher (23,9 vs. 4,01 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin für OP-Lysin und 0,82 vs. 0,33 $\mu\text{mol/mol}$ Lysin für *meta*-DLP). Diese Ergebnisse führen zur Schlussfolgerung, dass das Verhältnis zwischen GA und GX der entscheidende Faktor in der konkurrierenden Reaktion mit Lysin ist.

4.3 Photoinduzierte Bildung von ¹O₂ durch Pyridinium-AGEs

Molekularer Sauerstoff besitzt im Grundzustand eine Triplettmultiplizität, elektronisch angeregter Sauerstoff befindet sich im Singulettzustand. Singulett-Sauerstoff (¹O₂) stellt eine sehr reaktive Sauerstoffspezies dar und ist an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. So kann diese *in vivo* mit einer Vielzahl von biologischen Molekülen, wie z.B. DNA, Lipiden und Proteinen reagieren.¹⁷⁹ Die Anregung vom Triplett- in den Singulettzustand benötigt eine Energie von 95 kJ/mol.⁹⁰ Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, kann die dafür benötigte Energie in Gegenwart eines angeregten Photosensibilisators auf Sauerstoff übertragen werden. Aufgrund der hohen Reaktivität und Kurzlebigkeit von ¹O₂ ist es notwendig diesen effizient und selektiv für einen empfindlichen Nachweis einzufangen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Naphthalin-Derivaten, die in Anwesenheit von ¹O₂ zu den korrespondierenden Endoperoxiden reagieren (Abb. 33). In der Praxis werden verschiedene

hydrophile Funktionen in das Naphthalin-Grundgerüst integriert, um eine Löslichkeit in Wasser zu gewährleisten. Aubry *et al.* synthetisierten hierfür Dinatrium-1,4-naphthalindipropionat (NDP).¹⁸⁰ Diese wasserlösliche Verbindung wurde in der vorliegenden Arbeit für die Bestrahlungsexperimente verwendet.

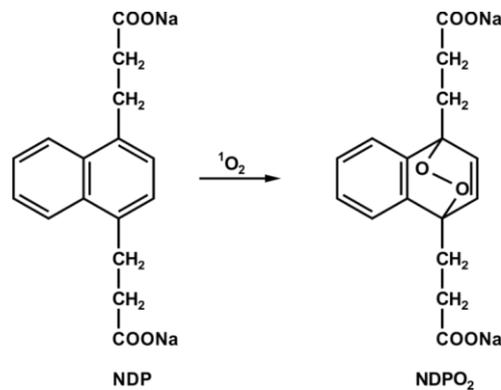
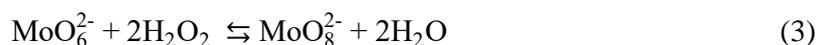


Abb. 33: Bildung von NDPO₂

Weiterführende Untersuchungen von Pierlot *et al.* zeigten, dass die Stabilität des Endoperoxids (NDPO₂) temperaturabhängig ist und in Wasser bei 37 °C eine Halbwertszeit von 23 min besitzt.⁹⁶ Infolgedessen wurden *meta*-DLP bzw. OP-Lysin in Anwesenheit von NDP in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) unter Eiskühlung bestrahlt und die Lösungen bis zur Detektion bei einer Temperatur von 0 bis 5 °C gehalten. Die Bestrahlung der Pyridinium-AGEs erfolgte mit einer wassergekühlten 50 W Quecksilberdampfampe unter Verwendung eines UG5 Bandpassfilters. Optische Bandpassfilter transmittieren selektiv einen Teil des Spektrums und reflektieren alle anderen Wellenlängen. Hierbei lag das transmittierte Licht zwischen 250 nm und 370 nm und entsprach somit den Anregungswellenlängen von OP-Lysin und *meta*-DLP. Der Nachweis von NDPO₂ erfolgte mittels LC-MS/MS.

Zur Verifizierung wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein authentischer Referenzstandard synthetisiert. Die Synthese von NDPO₂ erfolgte durch die chemisch induzierte Bildung von ¹O₂ durch ein Molybdat (MoO₄²⁻)/Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-System in Gegenwart von NDP. Molybdat-Ionen katalysieren die Disproportionierungsreaktion von H₂O₂ über das gelbgefärbte Diperoxomolybdat (MoO₆²⁻) unter Freisetzung von ¹O₂ (Gleichung 1 und 2). Entscheidend bei der Reaktion sind der pH-Wert und die eingesetzte Konzentration von H₂O₂. Ist diese zu hoch bildet sich das rotbraune Tetraperoxomolybdat (MoO₈²⁻), welches quantitativ weniger ¹O₂ bildet. Unter leicht sauren Bedingungen reagiert MoO₆²⁻ zur inaktiven Säure HMoO₆⁻ (Gleichung 3 und 4).¹⁸⁰





Durch portionsweise Zugabe von H_2O_2 war MoO_6^{2-} der vorherrschende Komplex bei der Reaktion. Nach erfolgter Aufarbeitung des Produktes (NDPO_2) gemäß Aubry *et al.* wurde die Struktur mittels $^1\text{H-NMR}$ untersucht.¹⁸⁰ Im Spektrum konnten sowohl Signale dem Edukt als auch dem Endoperoxid zugeordnet werden. Eine ausführliche Auswertung ist in Tab. 10 zusammengefasst.

Tab. 10: $^1\text{H-NMR}$ Daten von NDP und NDPO_2 in CD_3OD

H	δ ^1H [ppm]	δ ^1H [ppm]
1	7,08 (s, 2H)	6,88 (s, 2H)
2	7,49 (m, 2H) ^a	7,40 (m, 2H) ^a
3	7,29 (m, 2H)	7,23 (m, 2H)
4/5	2,55 (m, 8H)	2,51 (m, 8H)

Neben der Nutzung der NMR-Spektroskopie zur Strukturaufklärung lässt sich diese auch für die quantitative Analyse von Stoffgemischen einsetzen. Da die Fläche des Resonanzsignals (Integral) der Anzahl der dazugehörigen Kernen entspricht, lässt sich mit deren Hilfe die Zusammensetzung des Gemisches berechnen. Hierfür wurde das Signal H-1 herangezogen, welches in Folge der Ausbildung des Endoperoxids in das Hochfeld verschoben wurde. NDPO_2 hatte einen Anteil von 52% im Stoffgemisch. Für einen empfindlichen Nachweis wurde, wie im Kapitel 4.1.5 bereits beschrieben, eine Massenkalisierung („Tuning“) am Massenspektrometer durchgeführt. Die Fragmentierung des Endoperoxids erfolgte mittels Elektronenspray-Ionisation (ESI) im negativen Ionenmodus. Abb. 34 zeigt die Muttermasse ($[\text{M-H}]^-$ $m/z = 303$) des synthetisierten Standards und die charakteristischen Massenübergänge. Mithilfe der LC-MS/MS war eine spezifische und sensitive Detektion von NDPO_2 über die Retentionszeit ($t_R = 13,4$ min) und die selektierten Fragment-Ionen ($m/z = 271$, $m/z = 259$, $m/z = 215$ und $m/z = 183$) möglich.

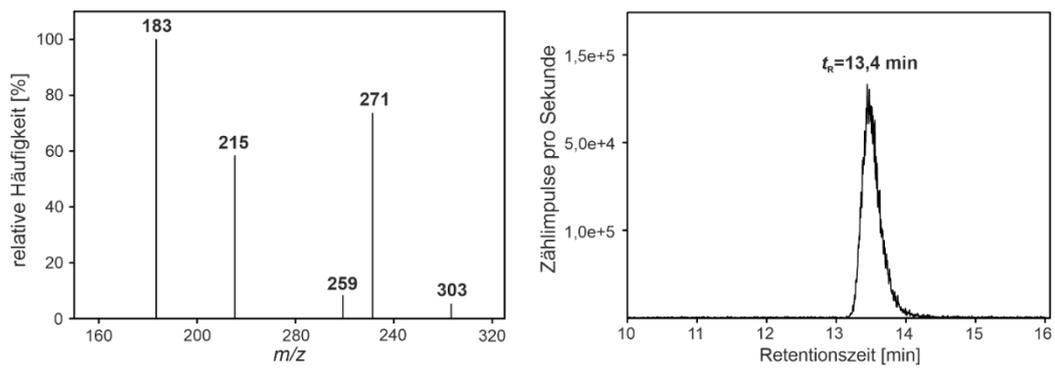


Abb. 34: Detektion des authentischen Referenzstandards (NDPO₂) mittels LC-MS/MS über Retentionszeit und kollisionsinduzierter Dissoziation (CID)

Nach der Verifizierung des synthetisierten Standards wurden die bereits zuvor beschriebenen, bestrahlten Lösungen (*meta*-DLP bzw. OP-Lysin in Anwesenheit von NDP) untersucht. In Folge der photosensibilisierten Bildung von ¹O₂ konnte NDPO₂ durch den direkten Vergleich mit dem Referenzstandard über Retentionszeit und Fragment-Ionen eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 35).

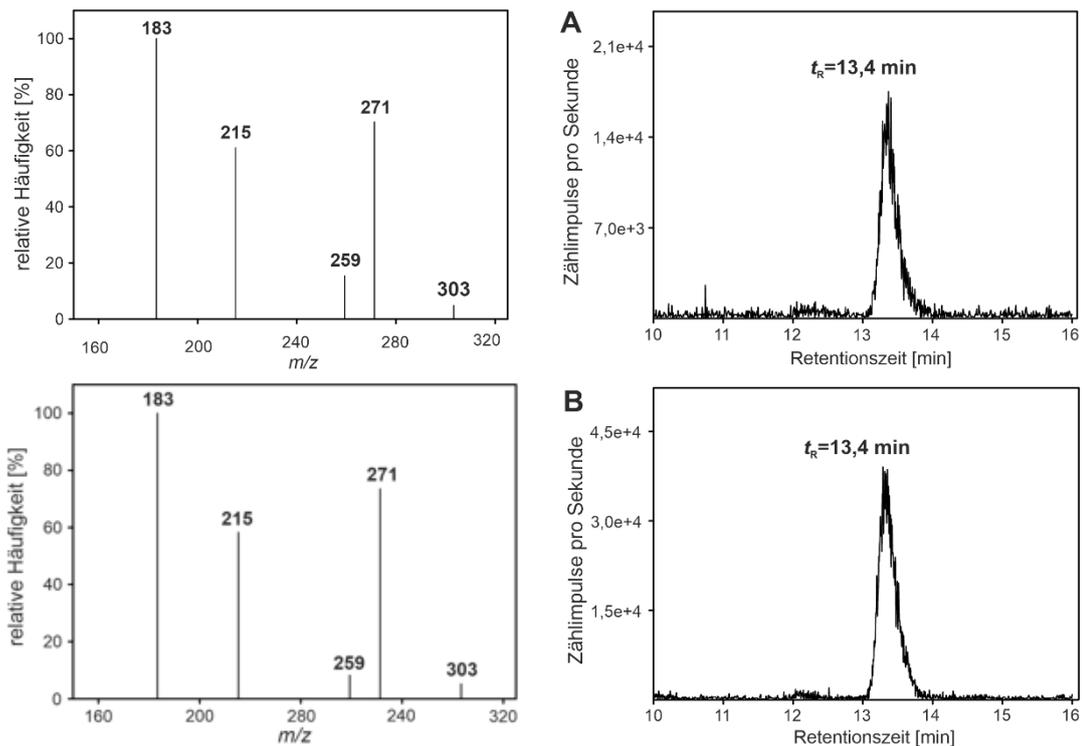


Abb. 35: Detektion von NDPO₂ in UV-bestrahlten Lösungen mit NDP und *meta*-DLP (A) und OP-Lysin (B)

Die Bestrahlung der Lösung ohne Zusatz von *meta*-DLP bzw. OP-Lysin führte nicht zur Bildung von NDPO₂. Da bereits sehr geringe Konzentrationen (1 μM) von *meta*-DLP und

OP-Lysin zur Bildung von $^1\text{O}_2$ führten, könnten diese Strukturen somit *in vivo*, insbesondere im Augenlinsenprotein, einen Einfluss auf die Bildung von oxidativen Stress besitzen.

4.4 Bildung von Pyridinium-AGEs in prozessierten Lebensmitteln

4.4.1 Untersuchung von kommerziellen Kartoffelchips

Thermisch prozessierte Lebensmittel weisen in Folge der Maillard-Reaktion einen erhöhten Anteil an modifizierten Proteinen auf. Die Ergebnisse aus den Modellinkubationen zeigten, dass kurzkettige α -Hydroxycarbonyle einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung von Pyridinium-AGEs besitzen. Um beide Aspekte zu verbinden wurden zunächst kommerzielle Kartoffelchips untersucht. Wie in Kapitel 2.3.1 bereits beschrieben spielt bei dem Frittierprozess neben den hohen Temperaturen auch die Lipidoxidation eine wichtige Rolle für die Bildung von Proteinmodifikationen. Die Lipidoxidation induziert die Bildung von kurzkettigen C_2 - und C_3 -Fragmentierungsprodukten, wie beispielsweise Glyoxal.^{181,182} Neueste Untersuchungen von Eggen *et al.* zeigten, dass die Lipidoxidation einen wesentlichen Einfluss auf die Bildung von Malondialdehyd-spezifischen Proteinmodifikationen besitzt.¹⁴³

Die verwendeten Handelsproben ($n = 20$) setzten sich dabei aus den deklarierten Zutaten Kartoffeln, Öl und Salz zusammen. Das gekennzeichnete Frittiermedium war Sonnenblumenöl, lediglich bei P 02 wurde ein Gemisch aus Mais-, Sonnenblumen- und Rapsöl in verschiedenen Gewichtsanteilen genutzt. Für die Analyse der AGEs wurden die Proben zunächst einer modifizierten Proteinisolierung nach Jost *et al.* jeweils in einer Dreifachbestimmung unterzogen.⁴⁹ Die schematische Darstellung der Proteinaufarbeitung ist in Abb. 36 dargestellt. Kartoffelchips bestehen überwiegend aus Stärke (~50%), Fett (~35%) und Protein (~5%), weitere Inhaltsstoffe sind Salz (~1%) und Ballaststoffe (~1%). Im ersten Schritt wurden die kommerziellen Kartoffelchips zerkleinert, homogenisiert und anschließend entfettet. Die enthaltene Stärke wurde mithilfe von hitzestabiler α -Amylase und Amyloglucosidase hydrolysiert. Die Proteine wurden mit absolutem Ethanol gefällt, das Proteinisolat anschließend lyophilisiert und in einer Schwingmühle homogenisiert. Ausgehend von diesen Homogenisaten wurde für jede Probe der Proteingehalt mit der Methode nach Kjeldahl bestimmt. Die erhaltenen Proteinisolate wiesen im Durchschnitt eine Reinheit von 48% und eine Proteinausbeute von 64% auf. Waglay *et al.* erzielten mit 63-75% vergleichbare Proteinausbeuten.¹⁸³ Ein Überblick der Ergebnisse ist in Tab. 11 dargestellt. Die Zuordnung der Probenbezeichnungen ist im Anhang aufgeführt.

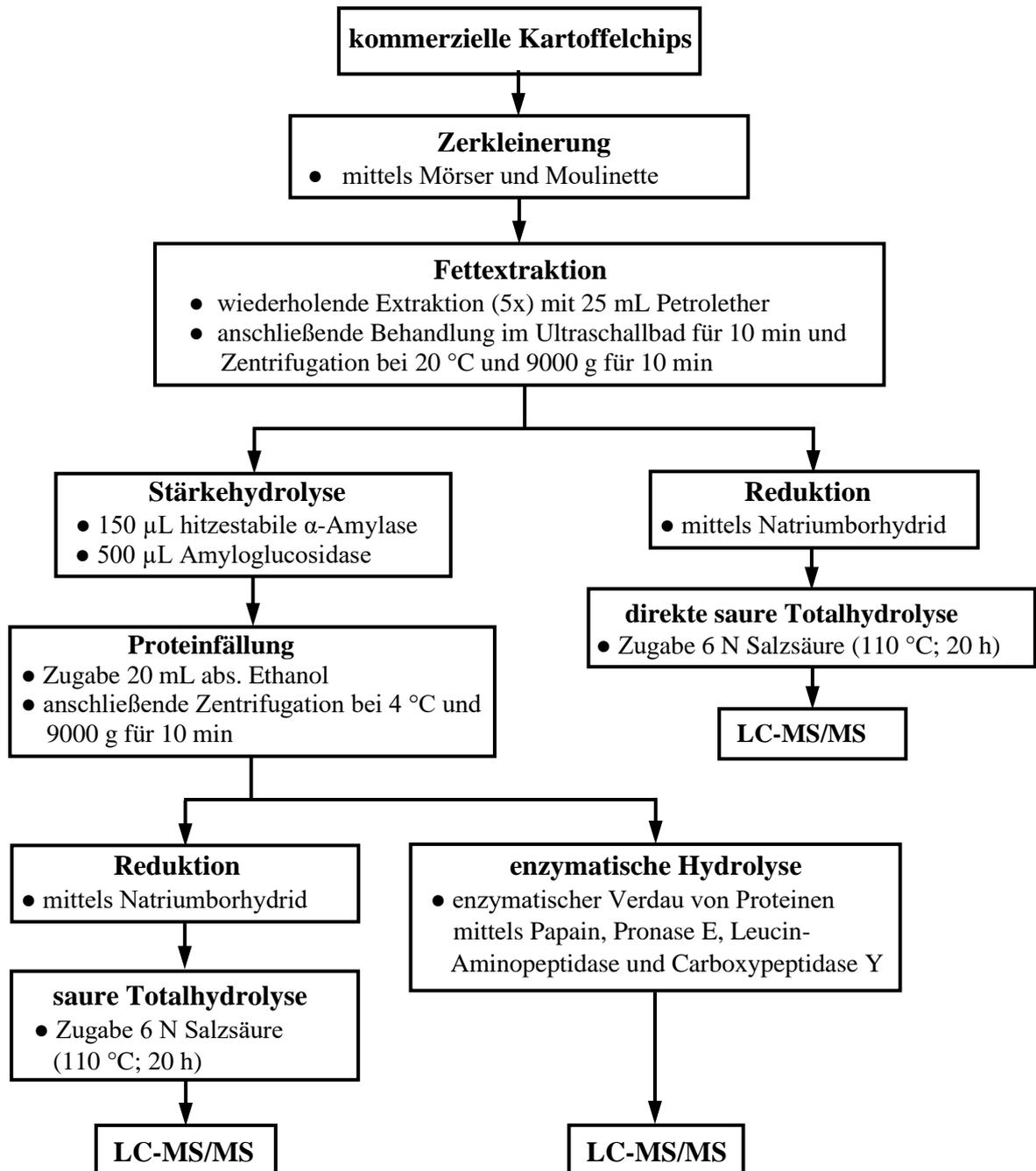


Abb. 36: Schematische Darstellung der Aufarbeitung von kommerziellen Kartoffelchips

Die unvollständige Proteinextraktion kann auf die nicht erfassten Zellwandproteine zurückzuführen sein, die bis zu 25% des Gesamtproteins ausmachen.¹³³ Zellwandproteine sind essentielle Bestandteile für den Auf- und Umbau sowie für die Stabilität der Zellwand, wobei die *Solanaceae*-Lectine eine intensiv untersuchte Gruppe darstellen.¹⁸⁴ Für eine vollständige Hydrolyse der Zellwand der Kartoffelknolle, die zu einem großen Teil aus Rhamnogalacturonan I und Homogalacturonan besteht, werden Endo-1,4- β -galactase und Polygalacturonase M1 eingesetzt.¹⁸³

Tab. 11: Übersicht der ermittelten Proteinausbeuten

Probenbezeichnung	Fett [%]	Protein [%]	Proteinausbeute [%]
P 01	32,1 ± 1,3	4,02 ± 0,29	66,6
P 02	29,7 ± 2,2	5,40 ± 0,07	58,8
P 03	29,5 ± 0,8	6,34 ± 0,03	58,8
P 04	32,8 ± 0,2	4,69 ± 0,12	62,3
P 05	30,1 ± 0,5	5,94 ± 0,11	58,2
P 06	16,5 ± 0,2	7,33 ± 0,23	54,8
P 07	30,4 ± 0,4	4,08 ± 0,06	69,9
P 08	31,7 ± 0,9	5,01 ± 0,11	79,2
P 09	24,9 ± 0,7	6,83 ± 0,03	53,2
P 10	35,2 ± 0,6	4,26 ± 0,13	57,9
P 11	30,3 ± 0,6	5,75 ± 0,12	58,8
P 12	33,4 ± 0,2	5,12 ± 0,08	77,0
P 13	27,0 ± 0,1	5,94 ± 0,08	54,4
P 14	29,2 ± 0,3	6,16 ± 0,12	57,6
P 15	19,2 ± 1,4	7,56 ± 0,10	57,8
P 16	18,5 ± 0,6	6,49 ± 0,18	66,4
P 17	30,9 ± 0,6	5,21 ± 0,17	56,7
P 18	43,6 ± 0,6	3,29 ± 0,07	85,3
P 19	20,3 ± 0,3	7,09 ± 0,09	67,8
P 20	18,5 ± 0,4	5,83 ± 0,10	73,1
Ø			63,7 ± 4,3

Um auszuschließen, dass eine unvollständige Proteinextraktion auch zu einer unvollständigen Bestimmung von AGEs führt, wurde ein Teil der entfetteten Proben und der Proteinisolate einer sauren Totalhydrolyse (6 N Salzsäure; 110 °C; 20 h) unterzogen und anschließend der Gehalt an CML mittels LC-MS/MS bestimmt. Allerdings kommt es unter diesen harschen Bedingungen zur artifiziellen Bildung von CML ausgehend von Amadori-Produkten, welche zu einem Überbefund an CML führen würde.² Aus diesem Grund wurden im Vorfeld der quantitativen Analyse das Proteinisolat und die entfetteten Kartoffelchips einer Reduktion mittels Natriumborhydrid im Überschuss unterzogen. Die detektierten Mengen aus den Proteinisolaten und aus den entfetteten Kartoffelchips sind in Tab. 12 gegenübergestellt und zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Tab. 12: Gehalte von CML in ausgewählten Proteinisolaten und entfetteten Kartoffelchips

[$\mu\text{g}/100 \text{ g Chips}$]	P 01	P 02	P 06
Kartoffelchips entfettet	290 ± 20	480 ± 30	330 ± 30
Proteinisolat	270 ± 20	450 ± 40	320 ± 30

Somit führt die unvollständige Proteinisolierung zu keiner Diskriminierung von AGEs. Wie in den Modellinkubationen wurde für eine sichere Quantifizierung die NWG und BG der einzelnen Analyten innerhalb der Matrix bestimmt, wobei die NWG als dreifache und die BG als zehnfache Rauschhöhe zur Retentionszeit der Verbindung gilt. Eine Übersicht ist in Tab. 13 dargestellt.

Tab. 13: NWG und BG von AGEs in Kartoffelchipsmatrix

Analyt	BG	NWG
	[mg/kg Protein]	[mg/kg Protein]
CEA	0,06	0,18
CML	0,05	0,16
CEL	0,04	0,13
DPL	0,06	0,18
Furosin	0,04	0,12
GOLD	0,04	0,12
GLAP	0,01	0,03
HEL	0,04	0,12
HOP-Lysin	0,01	0,03
<i>meta</i> -DLP	0,01	0,03
MOLD	0,03	0,10
OP-Lysin	0,01	0,04
Pyrralin	0,05	0,15
<i>N</i> ⁶ -Formyllysin	0,07	0,20
<i>N</i> ⁶ -Acetyllysin	0,06	0,18
<i>ortho</i> -Tyrosin	0,06	0,19

Mittels CID in einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals *meta*-DLP und OP-Lysin in prozessierten Lebensmitteln eindeutig nachgewiesen werden. Im CID wird die Fragmentierung ausgewählter Ionen in der Gasphase induziert. Der Quadrupol 1 wirkt als Massenfilter und beschleunigt nur ein ausgewähltes Ion, entsprechend des Masse-zu-Ladungsverhältnis, in die Kollisionszelle (Quadrupol 2). Die Kollision mit

neutralen Gasmolekülen bewirkt eine Destabilisierung des Analytmoleküls, die zur Dissoziation von Bindungen führt. Die dadurch resultierenden charakteristischen Tochterionen werden im Quadrupol 3 analysiert. Ausgehend von den Proteinhydrolysaten wurden die Pyridinium-AGEs zunächst mittels analytischer HPLC angereichert und störende Matrix entfernt. Diese Schritte wurden mehrfach wiederholt, sodass die Pyridinium-AGEs um den Faktor 20 angereichert wurden. Das erhaltene CID-Spektrum von *meta*-DLP ist in sehr guter Übereinstimmung mit dem CID-Spektrum des zuvor synthetisierten authentischen Referenzstandards (Abb. 37). Das Massenspektrum zeigte einen Molekülmassenpeak $[M]^+$ für *meta*-DLP bei m/z 353. Des Weiteren waren sechs wesentliche Fragment-Ionen detektierbar m/z 308, 224, 179, 130, 95 und 84. Ausgehend vom Molekülmassenpeak ergibt eine Decarboxylierung das Ion m/z 308, das Fragment-Ion m/z 224 repräsentiert das Pyridinium-Derivat nach Abspaltung einer Lysinseitenkette. Die Eliminierung der Amino-Funktion und die Cyclisierung von Lysin ergibt protonierte Pipecolinsäure (m/z 130). Durch die gleichzeitige Abspaltung von Wasser und CO entsteht das Pyrrolinium-Ion bei m/z 84.

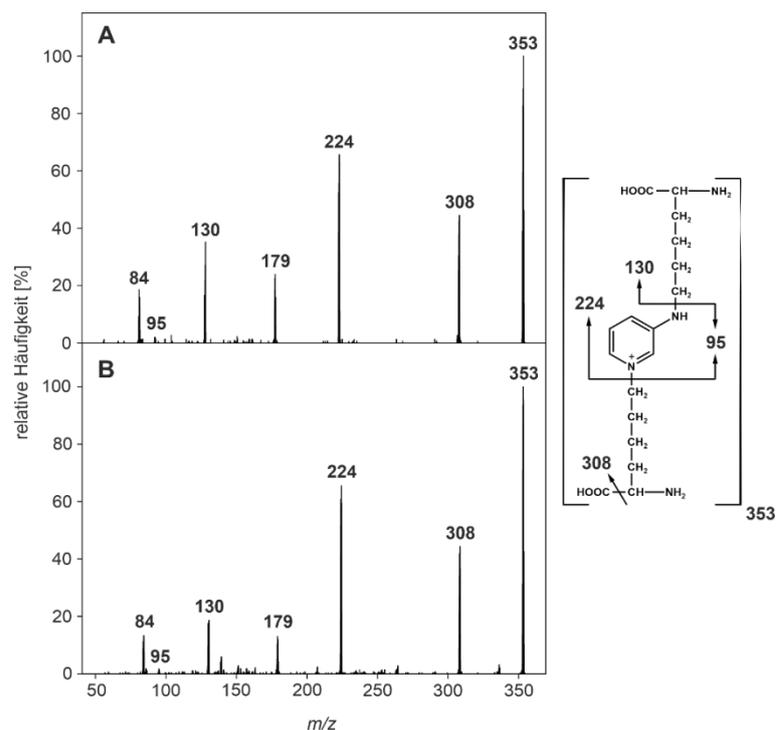


Abb. 37: CID-Spektrum von *meta*-DLP (A) authentischer Referenzstandard und (B) Kartoffelchips-Proteinhydrolysat

Das CID-Spektrum von OP-Lysin aus den Proteinhydrolysaten war identisch zu dem des synthetisierten Standards (Abb. 38). Die Molekül-Ion (m/z 225) sowie die Fragment-Ionen (m/z 130, 96 und 84) stimmten mit den Daten von Argirov *et al.* überein.⁴ Das Ion m/z 96 resultiert nach Abspaltung der Lysinseitenkette, m/z 130 und m/z 84 sind, wie bereits beschrieben,

charakteristische Massenübergänge für Lysin. Die G3-spezifische Proteinmodifikation GLAP konnte ebenfalls auf diese Weise nachgewiesen werden (siehe Anhang). Um auszuschließen, dass die Pyridinium AGEs Artefakte aufgrund der thermischen Belastung während der Proteinisolierung darstellen, wurden die Hydrolysate der entfetteten Chips untersucht. Die Detektion von *meta*-DLP, OP-Lysin und GLAP in diesen Hydrolysaten schloss die Bildung dieser Strukturen während der Aufarbeitung aus.

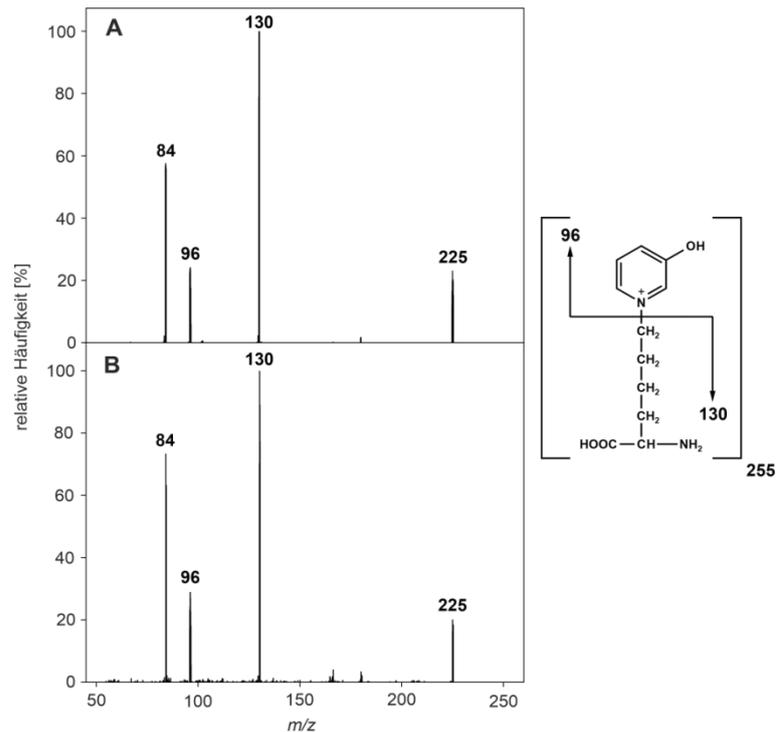


Abb. 38: CID-Spektrum von OP-Lysin (A) authentischer Referenzstandard und (B) Kartoffelchips-Proteinhydrolysat

Die vollständige Hydrolyse von Proteinen und die damit einhergehende Freisetzung proteingebundener AGEs umfasst zwei wichtige Faktoren: eine hohe Konzentration der eingesetzten Säure und hohe Temperaturen (6 N Salzsäure; 110 °C; 20 h). Die Quantifizierung erfolgte durch Standardaddition mittels LC-MS/MS nach saurer Totalhydrolyse. Ein Überblick der Ergebnisse ist in Abb. 39 dargestellt. Die breite Schwankung der einzelnen Analyten kann auf unterschiedliche technologische Faktoren wie Frittierdauer, Frittier Temperatur und unterschiedliche Vorbehandlungen der Kartoffelscheiben zurückzuführen sein. Ein weiterer Faktor ist die verwendete Kartoffelsorte. Die quantitativ bedeutendste säurestabile Proteinmodifikation war das MGX-spezifische CEL mit einem durchschnittlichen Gehalt von 700 µg/100 g. Die Gehalte des GX-Pendants (CML) schwankten zwischen 220 und 800 µg/100 g. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Werten, wobei hier breite Schwankungsbereiche sowohl für CEL (24 bis

2400 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) als auch für CML (15 bis 1500 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) angegeben werden.^{144,146,147,185} Das Verhältnis von CEL zu CML betrug 1,4:1 und ist vergleichbar mit dem Verhältnis MOLD zu GOLD (3:1). Die leicht unterschiedlichen Verhältnisse lassen sich durch die zusätzliche Bildung von CML aus der oxidativen Fragmentierung des Amadori-Produktes erklären.

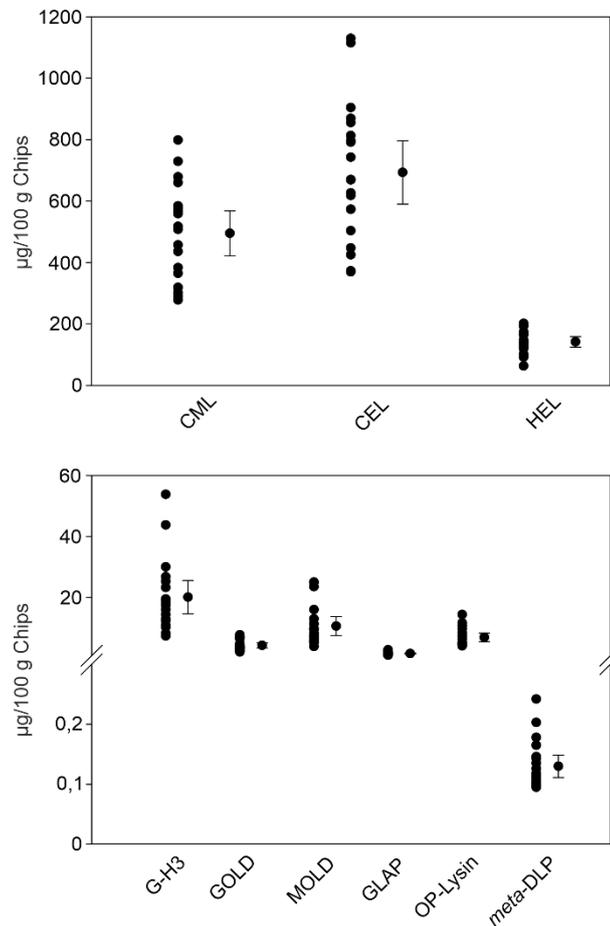


Abb. 39: Gehalte säurestabiler AGEs in kommerziellen Kartoffelchips

Die Modifikationen MOLD und GOLD sind bivalente Crosslinks und leiten sich von MGX bzw. GX ab. Da MOLD in höheren Mengen gebildet wurde, deutet dies darauf hin, dass MGX eine wesentliche Vorläuferstruktur für die AGE-Bildung in frittierten Kartoffelchips darstellt. Dies konnte bereits in mehreren Untersuchungen festgestellt werden, hier wurde MGX im Vergleich zu GX in zweifach höheren Mengen detektiert.^{145,186} Andere Autoren wiederum berichteten genau das Gegenteil.¹⁸⁷ Untersuchungen von Ledbetter *et al.* zeigten, dass die Vorbehandlung von Kartoffelscheiben einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von MGX besitzt, so führte eine Vorbehandlung der Kartoffelscheiben mit 0,1 M Citronensäure zu signifikant geringeren Mengen.¹⁴⁴

Für die Erfassung von Arginin-Modifikationen diente die Detektion des GX-spezifischen Imidazolinons (G-H3). G-H3 dient in der sauren Totalhydrolyse als Summenparameter für Dihydroxyimidazolinon und CMA, wobei Ersteres das kinetisch kontrollierte Intermediat repräsentiert.⁶⁵ Der durchschnittliche Gehalt in den kommerziellen Kartoffelchips lag bei 19,8 µg/100 g. Neben dem qualitativen Nachweis von *meta*-DLP, OP-Lysin und GLAP in frittierten Kartoffelscheiben konnten diese Strukturen ebenfalls quantitativ erfasst werden. Im Vergleich zu CEL wurde OP-Lysin in 100-fach geringeren Mengen und GLAP in 450-fach geringeren Mengen detektiert. Der durchschnittliche Gehalt von *meta*-DLP betrug 0,12 µg/100 g. Somit werden die Pyridinium-AGEs in deutlich geringeren Konzentrationen gebildet. Ungeachtet dessen zeigt dies, dass beim Frittieren von stärkehaltigen Lebensmitteln kurzkettige α -Hydroxycarbonyle wie GA und G3 gebildet werden und diese mit Proteinen interagieren. Überraschenderweise konnte in keinem Proteinisolat die GA-spezifische Proteinmodifikation HOP-Lysin quantifiziert werden, die gebildeten Mengen lagen deutlich unter der BG. Infolgedessen muss GA auf anderem Wege weiterreagieren oder wird während des Frittierprozesses schnell zu GX oxidiert.

Im Allgemeinen sind nur wenige AGEs unter den Bedingungen der sauren Totalhydrolyse stabil. Für die Detektion von säurelabilen Strukturen müssen diese zunächst durch einen mehrstufigen, enzymatischen Verdau aus den Proteinen freigesetzt werden. Obwohl die enzymatische Hydrolyse unter milden Bedingungen durchgeführt und somit die unterschiedliche Stabilität verschiedener AGEs berücksichtigt wird, ist der Nachteil dieser Methode die verminderte Effektivität gegenüber der sauren Hydrolyse. Aufgrund der hohen Substratspezifität der eingesetzten Enzyme binden nur wenige Substrate an das aktive Zentrum des Enzyms.^{103,188} Um dennoch einen hohen Hydrolysegrad zu erzielen, werden in der Praxis Mischungen unterschiedlicher Proteasen eingesetzt, die die Bindungen möglichst unspezifisch spalten. In der vorliegenden Arbeit wurden dazu die Proteinisolate (n= 20) zusammengeführt und ohne Reduktionsschritt jeweils in Dreifachbestimmung mit verschiedenen Proteasen enzymatisch hydrolysiert. In der Kartoffel wurden bereits mehrere Proteinfamilien identifiziert, die kovalente Disulfidbindungen ausbilden. So besteht z.B. der Proteaseinhibitor Typ II aus zwei Domänen, die durch acht Disulfidbrücken verbunden werden.¹⁸⁹ Daher wurde im ersten Schritt innerhalb von 24 h zweimal die Cysteinprotease Papain zur Spaltung von Disulfidbrücken eingesetzt. Danach wurde das Proteinisolat sukzessive durch die Endopeptidase Pronase E und anschließend durch die Exopeptidasen Leucin-Aminopeptidase und Carboxypeptidase Y in weiteren vier Tagen verdaut. Ein hoher Glykierungsgrad bzw. ein hoher Anteil an Crosslink-Strukturen, wie es in einem hochprozessierten Lebensmittel zu erwarten ist, wirkt dem Hydrolysegrad entgegen. Die Bestimmung des Hydrolysegrads erfolgte

über die säurestabile Aminosäuremodifikation CEL und lag bei 40%. Die für die saure Hydrolyse ermittelten Ergebnisse wurden als 100% angenommen und die Quantifizierung der säurelabilen AGEs dementsprechend angepasst. Die ermittelten Gehalte ausgewählter säurelabiler Strukturen sind in Tab. 14 zusammengefasst.

Tab. 14: Gehalte ausgewählter säurelabiler AGEs in kommerziellen Kartoffelchips

AGE	[$\mu\text{g}/100\text{ g}$ Kartoffelchips]
CEA	650 ± 60
MG-H1/H3	500 ± 50
Pyrralin	880 ± 80
K2P*	$< \text{NWG}$
N^{δ} -Formyllysin	950 ± 90
N^{δ} -Acetyllysin	500 ± 50
<i>ortho</i> -Tyrosin	180 ± 20

* simulierte Massenübergänge

Eine quantitativ relevante Struktur war Pyrralin mit einem Gehalt von $880 \pm 80\ \mu\text{g}/100\text{ g}$. Pyrralin ist eine bekannte Proteinmodifikation, die unter sauren Bedingungen vollständig zu Lysin reagiert und in Weizenbrötchen eine relevante Rolle spielt.^{49,190} Überraschenderweise wurde N^{δ} -Formyllysin mit einem Gehalt von $950 \pm 90\ \mu\text{g}/100\text{ g}$ als quantitativ bedeutendstes AGE in Kartoffelchips identifiziert und übertraf damit die durchschnittlichen Gehalte von CML und CEL. Zudem konnten relevante Mengen N^{δ} -Acetyllysin ($500 \pm 50\ \mu\text{g}/100\text{ g}$) nachgewiesen werden. Die Bildung dieser Strukturen erfolgt über die β -Dicarbonylspaltung bestimmter Reduktone. Dabei stammt N^{δ} -Formyllysin von Glucoson bzw. Maltoson ab, während N^{δ} -Acetyllysin aus 1-Desoxyosonen wie 1-DG, 1-Desoxythreoson und 1-Desoxypentose gebildet wird. Dagegen wird Pyrralin aus Desoxyosonen wie 3-DG und 3-Desoxymaltoson gebildet. Geht man bei N^{δ} -Formyllysin und N^{δ} -Acetyllysin von Reduktonstrukturen als einzigen Reaktionsmechanismus aus, müssen diese während des Frittierens in relevanten Mengen gebildet werden. Allerdings ist die Bildung von N^{δ} -Acetyllysin weiterhin über die enzymatische und nicht-enzymatische Acetylierung von Lysin durch Acetyl-Coenzym A Thioester in der Literatur bekannt.^{191,192} Neben 3-Desoxymaltoson, Maltoson, 1-Desoxymaltoson und 1,5-Didesoxymaltoson-4-en sind 3-DG, 3-Desoxygalactose und Glucoson die quantitativ wichtigsten 1,2-Dicarbonyle in Lebensmitteln.^{49,193} In Pommes frites wurden sechsfach höhere Mengen 3-DG als MGX detektiert, eine umfassende Analyse der Reduktonstrukturen blieb allerdings aus.¹⁹⁴ Die

dominantesten Arginin-Proteinmodifikationen waren in den vorliegenden Ergebnissen das endocyclische bzw. exocyclische Dihydroxyimidazolone MG-H3 und MG-H1 und *N*⁷-Carboxyethylarginin (CEA). MG-H3 gilt als kinetisch kontrolliertes Intermediat und kann aufgrund seiner Reaktivität mit einem weiteren Molekül MGX zu Argpyrimidin bzw. Tetrahydropyrimidin weiterreagieren. Durch eine Ringöffnung steht MG-H3 über eine offenkettige Struktur (CEA) mit MG-H1 im Gleichgewicht, wobei dieses unter sauren Bedingungen auf die Seite von MG-H3 verschoben ist (Abb. 40).¹⁹⁵

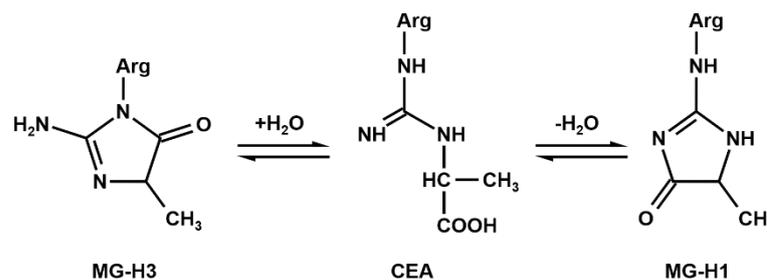


Abb. 40: Gleichgewicht zwischen MG-H3, CEA und MG-H1

MG-H1 und CMA repräsentieren die thermodynamisch kontrollierten Produkte. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von MG-H1 und MG-H3 besaßen beide Verbindungen nach flüssigchromatographischer Trennung ähnliche Retentionszeiten (siehe Anhang). Infolgedessen konnte keine Basislinientrennung erzielt werden und beide Strukturen wurden als ein Parameter zusammengefasst (Tab. 14). Obwohl MG-H1 aufgrund des Wasserverlustes beim Frittieren als Hauptprodukt erwartet wurde, konnten MG-H1/H3 und CEA in einem ähnlichen Konzentrationsbereich detektiert werden.

ortho-Tyrosin konnte in den enzymatisch hydrolysierten Proteinisolaten mit einem Gehalt von 180 µg/100 g detektiert werden. Diese Verbindung stellt das Isomer zum natürlich vorkommenden *para*-Tyrosin dar und wird über die Oxidation von proteingebundenen Phenylalaninresten durch Hydroxylradikale gebildet. Hydroxylradikale stellen hochreaktive Intermediate dar, die u.a. während der Lipidperoxidation durch den Abbau von Hydroperoxiden gebildet werden. Die Entstehung dieser Radikale wird in Gegenwart von Übergangsmetallen, die bereits in geringen Mengen prooxidativ wirken, katalysiert. Neben der Etablierung von *ortho*-Tyrosin als Protein-Oxidationsmarker *in vivo*, stellt diese Struktur auch einen potentiellen Marker zur Identifizierung von mit γ -Strahlung behandelten Lebensmitteln dar.^{56,196} Allerdings konnte *ortho*-Tyrosin in mehreren Untersuchungen auch in unbehandelten Lebensmitteln nachgewiesen werden.^{197,198} Die Identifizierung dieser Struktur in Kartoffelchips lässt sich durch die Bildung von Hydroxylradikalen infolge der Lipidperoxidation erklären. Die Analyse der enzymatischen Hydrolyse ermöglichte es

abschließende Betrachtungen zu K2P zu machen. Da der Crosslink unter diesen milden Bedingungen der enzymatischen Hydrolyse als stabil beschrieben wird, sollte dieser direkt detektierbar sein. Dazu wurden simulierte Massenübergänge, basierend auf den in der Literatur angegebenen massenspektroskopischen Daten, verwendet.⁵ Jedoch konnte in keinem Proteinisolat K2P detektiert werden. Ebenso konnte in der sauren Totalhydrolyse kein *para*-DLP, ein mögliches Abbauprodukt von K2P in Folge der sauren Aufarbeitung, nachgewiesen werden. Basierend auf diesen und den Ergebnissen der Modellinkubationen ist daher die postulierte Struktur von K2P unplausibel.

4.4.2 Synthese von *N*⁶-(2,3-Dihydroxypropyl)-Lysin

Um einen tiefgreifenden mechanistischen Einblick hinsichtlich der Bildung von AGEs während des Frittierens zu erlangen, ist die Untersuchung von reaktiven Carbonylen von besonderer Bedeutung. Zur Erfassung von freien und kurzlebigen α -Dicarbonylen werden diese durch die Verwendung von Derivatisierungsreagenzien in stabile Umsetzungsprodukte überführt. Durch die Reaktion mit *ortho*-Phenylendiamin (OPD) werden α -Dicarbonyle in stabile Chinoxaline überführt. In Anbetracht der mechanistisch beschriebenen Beteiligung von α -Hydroxycarbonylen an der Bildung von Pyridinium-Proteinmodifikationen, repräsentiert die Bestimmung von GA und G3 einen zentralen Aspekt der Untersuchung. Im Gegensatz zu α -Dicarbonylen führt die Umsetzung von GA bzw. G3 mit OPD zu Benzimidazolidinen, die leicht zu den entsprechenden Benzimidazolen weiterreagieren. Untersuchungen von Voigt *et al.* zeigten, dass ein vollständiges Abfangen von α -Hydroxycarbonylen mittels OPD nicht möglich ist. So betrug die Wiederfindungsrate für G3 76% und für GA nur 38%.¹⁹⁹ Die Derivatisierung von G3 mittels 3-Methyl-1-phenyl-5-pyrazolon führte hingegen zu deutlich höheren und reproduzierbaren Wiederfindungsraten (>98%), eine Untersuchung zur Derivatisierung von GA blieb aus.²⁰⁰

Mit den zuvor beschriebenen Methoden wird nicht die Gesamtmenge der Carbonyle erfasst, sondern nur die Konzentration der freien Strukturen. Eine alternative Möglichkeit ist die Bestimmung der Carbonyle im proteingebundenen Zustand. Durch die Reaktion von Lysin mit reaktiven, kurzkettigen Carbonylstrukturen kommt es im Sinne der Maillard-Reaktion zur Bildung entsprechender Imin-Intermediate. Durch Reduktion mit NaBH₄ führt das GX-Imin zum hinreichend stabilen HEL (Abb.41). Analog dazu ergibt die Reduktion von G3-Imin *N*⁶-(2,3-Dihydroxypropyl)-Lysin (DPL). Die G3-spezifische Proteinmodifikation wurde bislang in einigen wenigen Studien untersucht.^{201,202} Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Unterscheidung zwischen GA- und GX-Iminen mittels NaBD₄ (siehe Kapitel 4.2.2).

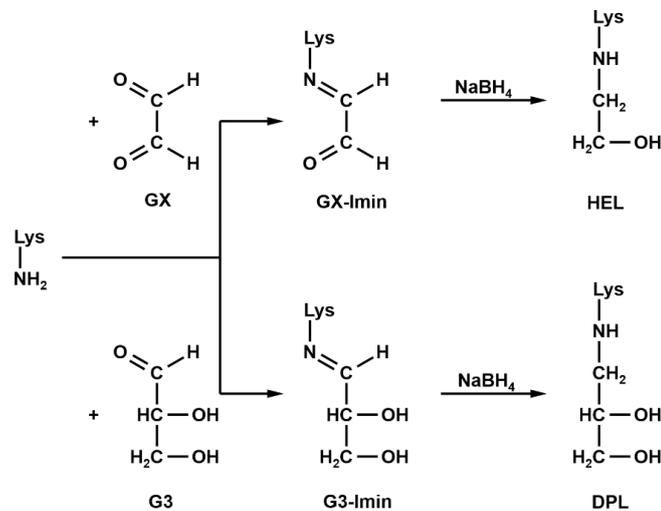


Abb. 41: Bildung von HEL und DPL

Für die Synthese von DPL wurde G3 mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin in Anwesenheit von Natriumcyanoborhydrid (NaBH₃CN) reaktiv aminierte. Das erhaltene Produkt wurde zunächst säulenchromatographisch aufgereinigt und im zweiten Schritt die säurelabile Boc-Schutzgruppe mittels saurer Hydrolyse entfernt (Abb. 42). DPL wurde als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 27% erhalten und mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die 2D-NMR Methoden COSY, HMQC, HMBC sowie das Spektrum der HR-MS bestätigten die Identität der synthetisierten Molekülstruktur (siehe Anhang).

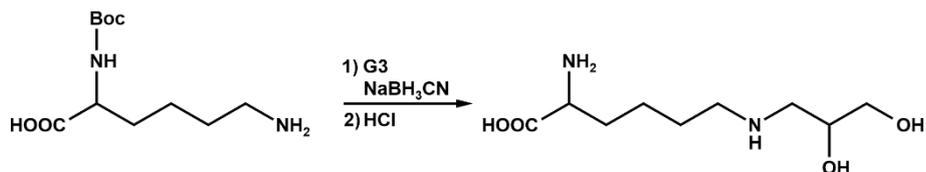


Abb. 42: Darstellung von DPL

4.4.3 Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Frittierens

Um einen tieferen Einblick in die mechanistischen Zusammenhänge zwischen Vorläuferstrukturen, Frittierbedingungen und Folgestrukturen zu gewinnen, wurden Kartoffelscheiben zeitaufgelöst (0 bis 16 min) frittiert. Insgesamt wurde eine Kartoffelsorte (Karelia) in drei unabhängigen Versuchsreihen untersucht, wobei Sonnenblumenöl bei einer Temperatur von 160 °C als Frittiermedium diente. Die frittierten Kartoffelscheiben wurden nach dem zuvor beschriebenen Schema (siehe Kapitel 4.4.2) entfettet, reduziert, direkt sauer hydrolysiert und mittels LC-MS/MS analysiert. Für die Bestimmung von Furosin wurde auf den

Reduktionsschritt verzichtet. Die Bildungsverläufe von CML, CEL, Furosin und Pyridinium-AGEs sind in Abb. 43 gezeigt. Die detektierten Gehalte stiegen erwartungsgemäß während des Frittierens kontinuierlich an. Nach elf Minuten konnte ein deutlicher Anstieg für alle Analyten verzeichnet werden. Der Grund hierfür waren das Verdampfen des Wassers an der Oberfläche der Kartoffelscheiben und die Ausbildung einer Krustenregion. Die damit einhergehende geringere Wasseraktivität begünstigte sowohl die Bildung von Maillard-Produkten als auch die Bräunung des Frittierguts. Bereits in mehreren Untersuchungen konnte bewiesen werden, dass die Bräunung mit dem Wassergehalt korreliert.^{49,203} Die gesamte Frittierdauer war im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen ca. acht Minuten länger. Yuan *et al.* konnten feststellen, dass der Wassergehalt von frittierten Kartoffelscheiben innerhalb von sechs Minuten von 80% auf 2% sank.²⁰⁴ Hierbei ist noch zu beachten, dass die verwendete Frittieretemperatur in der Literatur 180 °C und in der vorliegenden Arbeit 160 °C betrug. Zudem ist das Verdampfen von Wasser abhängig von der Frittieretemperatur, der Dicke der Kartoffelscheiben und dem Frittiertgut-zu-Öl-Verhältnis.

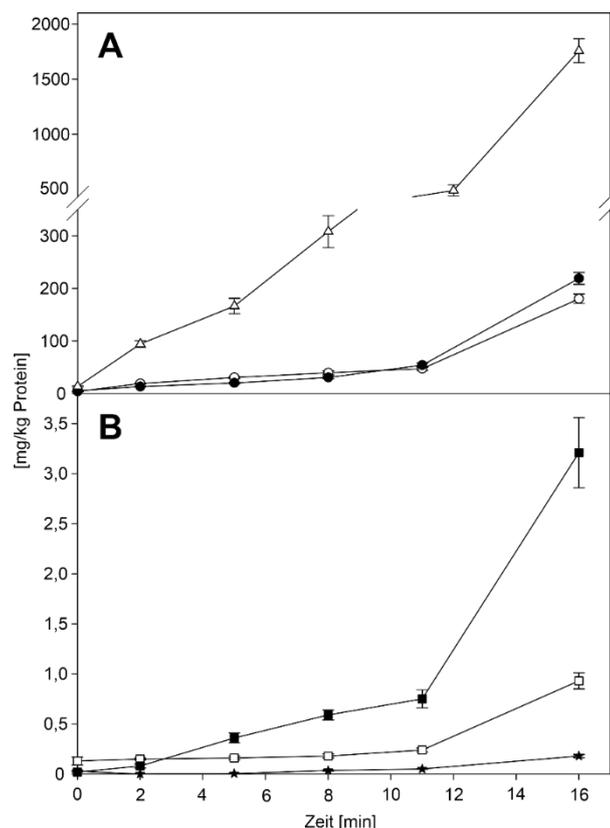


Abb. 43: Bildung von AGEs während des Frittierens von Kartoffelscheiben. (A) Δ Furosin, \bullet CEL, \circ CML und (B) \blacksquare OP-Lysin, \square GLAP und \star meta-DLP

In rohen Kartoffelscheiben betrug der CML-Gehalt 3,7 mg/kg Protein und stieg nach dem Frittieren auf 180 mg/kg Protein an. Ähnliche Bildungsdaten wurden für CEL detektiert, hier

erhöhten sich die Gehalte von 3,6 mg/kg Protein auf 210 mg/kg Protein. Somit resultierte ein Verhältnis von 1,2:1 (CEL:CML) und war vergleichbar mit dem Ergebnis, welches bei der Untersuchung von kommerziellen Kartoffelchips erhalten wurde. Analytisch wurden die Amadori-Produkte als Furosin erfasst, das bei der sauren Proteinhydrolyse als Artefakt zu etwa 40 Mol-% aus dem Amadori-Produkt entsteht.⁶² Die Gehalte stiegen kontinuierlich über die gesamte Frittierdauer von 13 mg/kg Protein auf 1750 mg/kg Protein an. Der detektierte Gehalt der Amadori-Produkte machte einen Großteil der proteingebundenen Maillard-Produkte in den frittierten Kartoffelscheiben aus. Des Weiteren konnten die Pyridinium-AGEs *meta*-DLP, GLAP und OP-Lysin quantitativ erfasst werden. Während die Gehalte von *meta*-DLP und GLAP in den ersten Minuten quasi unverändert blieben, stieg der OP-Lysin-Gehalt von 0,20 mg/kg Protein auf 0,75 mg/kg Protein innerhalb von elf Minuten an. In der letzten Zeitstufe erhöhte sich der Gehalt aller Pyridinium-AGEs um den Faktor vier. Die Gehalte der GA-spezifischen Proteinmodifikation HOP-Lysin lagen, wie bei den kommerziellen Kartoffelchips, unterhalb der BG. Generell lagen die ermittelten AGE-Gehalte in den frittierten Kartoffelscheiben im Bereich der kommerziellen Kartoffelchips und stimmten gut mit den beschriebenen Daten überein.^{144,146,147,185}

Weiterhin wurde die Bildung der Vorläuferstrukturen GA, GX und G3 im proteingebundenen Zustand untersucht. Hierfür wurden die aufgearbeiteten Kartoffelchips separat mit NaBH₄ bzw. NaBD₄ reduziert. Die Reduktion mit NaBD₄ führte zur Differenzierung von GA und GX, wobei GX-Imine zum zweifach-deuterierten HEL-2D und GA-Imine zum einfach-deuterierten HEL-1D reagierten. Die Reduktion mit NaBH₄ ergibt aus dem G3-Imin das zuvor beschriebene DPL. Die Bildungsverläufe von Gesamt-HEL und DPL sind in Abb. 44A dargestellt. Beide Strukturen zeigten ähnliche Bildungsraten, so stieg der Gehalt von HEL innerhalb von elf Minuten von 2 mg/kg Protein auf 25 mg/kg Protein und erreichte danach eine Plateauphase. Modellinkubationen mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin und GX unter milden Bedingungen zeigten, dass die Bildung von Gesamt-HEL bereits nach 3 h abnahm und die reaktiven GX-Imine im weiteren Verlauf der Maillard-Reaktion zu stabileren Produkten reagierten.⁵⁶ Somit deutete die Plateauphase darauf hin, dass die gebildeten Imine zum einen zu stabileren Produkten weiterreagierten und zum anderen gleichzeitig durch reaktive Carbonyle in ähnlichen Mengen neu gebildet wurden. Dieses Ergebnis geht einher mit dem Anstieg der Proteinmodifikationen nach einer Frittierdauer von elf Minuten (Abb. 43). Für HEL und DPL konnten über den gesamten Frittierprozess hinweg sehr ähnliche Gehalte bestimmt werden. Somit stellt G3 eine quantitativ bedeutende Vorläuferstruktur im Frittierprozess dar. In Abb. 44B ist der zeitliche Verlauf der Bildung von HEL-1D als prozentualer Anteil am gesamten HEL dargestellt. Der Anteil von HEL-1D betrug nach 2 min 23% und sank kontinuierlich auf 7%. GA wird während

des Frittierprozesses sehr schnell zu GX oxidiert, welches demnach die dominante Vorläuferstruktur darstellt. Nichtsdestotrotz konnten detektierbare Mengen GA nachgewiesen werden. Die gebildeten Mengen GA reichten allerdings nicht aus um HOP-Lysin in quantifizierbaren Mengen zu bilden. GA-Imine reagierten vermutlich in Anwesenheit mit verschiedenen Carbonylstrukturen, z.B. mit GX oder mit G3 und führten somit zu anderen Strukturen.

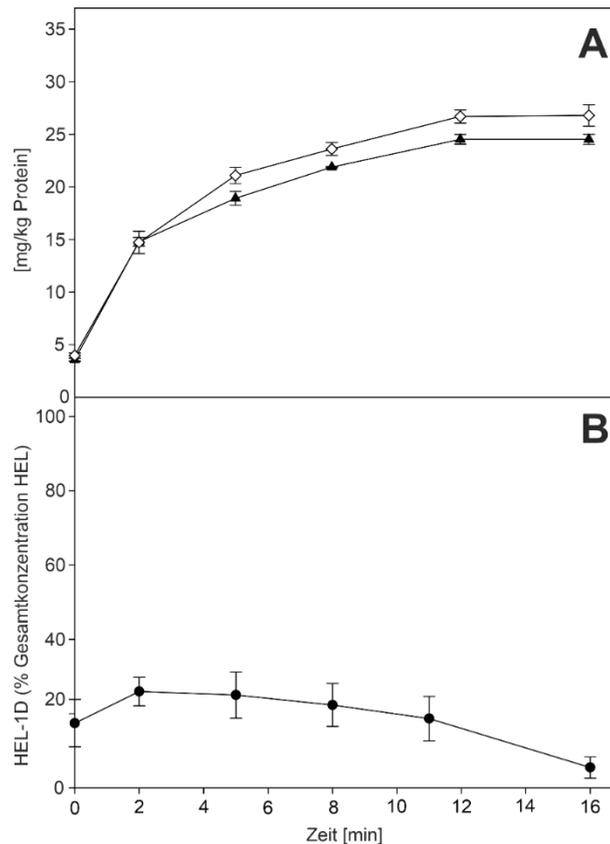


Abb. 44: Bildung von Vorläuferstrukturen während des Frittierens von Kartoffelscheiben. (A) ○ absoluter Gehalt von HEL (Gesamtkonzentration HEL, Summe aus HEL-1D und HEL-2D), ▲ DPL und (B) ● HEL-1D relativ zur Gesamtkonzentration von HEL

4.4.4 Bildung von AGEs in Rindfleischbratlingen

Die Ergebnisse aus den Modellinkubationen im Kapitel 4.2.2 zeigten, dass neben kurzkettigen Carbonylverbindungen insbesondere Ribose eine potente Vorläuferstruktur für Pyridinium-AGEs darstellt. Quantitativ relevante Mengen des C₅-Zuckers kommen in Muskelfleisch vor. Des Weiteren stellen Glucose, Glucose-6-phosphat und Ribose-5-phosphat quantitativ wichtige Kohlenhydrate dar.^{205,206} Ribose und Cystein nehmen bei der Aromabildung von Fleisch eine zentrale Rolle ein und führen unter anderem zu charakteristischen Aromaprodukten wie z.B. Alkylthiazolen und Thiofuranen.^{207,208} Weiterhin besteht Rindfleisch aus 7% Fett, 69% Wasser

und 21% Protein.²⁰⁹ Nach dem Schlachten kommt es zu weitgreifenden biochemischen Veränderungen im Fleisch. So werden durch den Mangel an Sauerstoff Glykogen und Glucose im anaeroben Milieu zu Milchsäure abgebaut und der pH-Wert sinkt von 7,2 auf 5,5. Eine weitere Folge des Sauerstoffmangels ist, dass keine oxidative Phosphorylierung über die Atmungskette erfolgt und ATP sukzessive abgebaut wird. Der postmortale ATP-Stoffwechsel erfolgt schrittweise über mehrere Enzyme durch Phosphatabspaltung und Desaminierung zunächst zu Inosin-5-phosphat. Durch Dephosphorylierung reagiert dieses Zwischenprodukt zu Inosin und letztendlich zu Hypoxanthin und Ribose. Das bedeutet, dass es während der postmortalen Lagerung von Fleisch zu einer Freisetzung von reduzierenden Zuckern durch den enzymatischen Abbau von Ribonucleotiden kommt. Koutsidis *et al.* untersuchten die Bildung von Ribose während der Lagerung von Fleisch und konnten eine Zunahme von 0,25 mmol/kg auf 1,67 mmol/kg nach 21 Tagen bei einer Lagertemperatur von 4 °C feststellen.²⁰⁵ Infolgedessen wurde in vorliegender Arbeit zunächst der Gehalt von Ribose in rohen Rindfleisch bestimmt.

4.4.5 Quantifizierung von Ribose in Fleisch

Für die Quantifizierung von Ribose in rohem Rinderhackfleisch wurde eine etablierte Methode nach Rakete *et al.* genutzt.²¹⁰ Der reduzierende Zucker wurde mit 1-Naphthylamin durch reduktive Aminierung zum entsprechenden Naphthylderivat umgesetzt (Abb. 45).

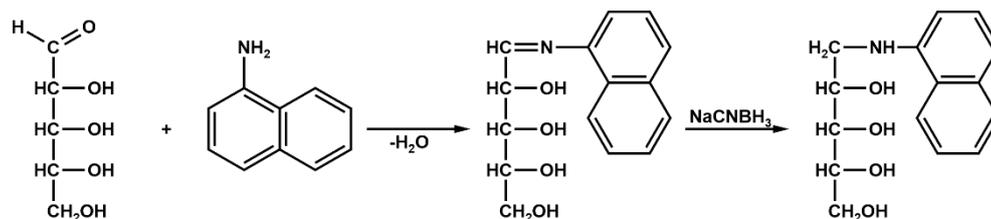


Abb. 45: Derivatisierung von Ribose mit 1-Naphthylamin

Dies führte zu einer Änderung der Polarität der Pentose, weshalb die flüssig-chromatographische Trennung der Struktur auf einer Umkehrphase erfolgte, und zum anderen konnte durch die Einführung eines Fluorophors auf eine Detektion mittels HPLC-FLD zurückgegriffen werden. Für die Bestimmung von Ribose wurde das rohe Fleisch in einer Dreifachbestimmung aufgearbeitet. Im ersten Schritt wurden die Proben lyophilisiert und anschließend mit Petrolether entfettet. Danach erfolgte eine Homogenisierung der entfetteten Proben mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Trichloressigsäure gefällt. Der Überstand wurde mittels 1-Naphthylamin und NaCNBH₃ versetzt und der HPLC-FLD zugeführt. In rohen Rinderhackfleisch konnte somit ein Gehalt für

Ribose von 0,41 mmol/kg Fleisch bestimmt werden. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den beschriebenen Werten in der Literatur.²⁰⁵

4.4.6 Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Grillens

Die Bildung von AGEs während des Grillens von rohen Rindfleischbratlingen wurde untersucht. Dafür wurden die Bratlinge gleichmäßig geformt und für 2, 4 und 6 min bei 230 °C von beiden Seiten in einem Kontaktgrill erhitzt. Die Kerntemperatur des Fleisches blieb nach 4 min konstant bei 95 °C. Die gegrillten Bratlinge wurden dann in einer Moulinette homogenisiert, anschließend lyophilisiert und mit Petrolether entfettet. Die Quantifizierung der Proteinmodifikationen erfolgte nach Reduktion mit NaBH₄ und direkter saurer Hydrolyse mittels LC-MS/MS. Die Bildungsverläufe ausgewählter säurestabiler Proteinmodifikationen sind in Abb. 46 dargestellt.

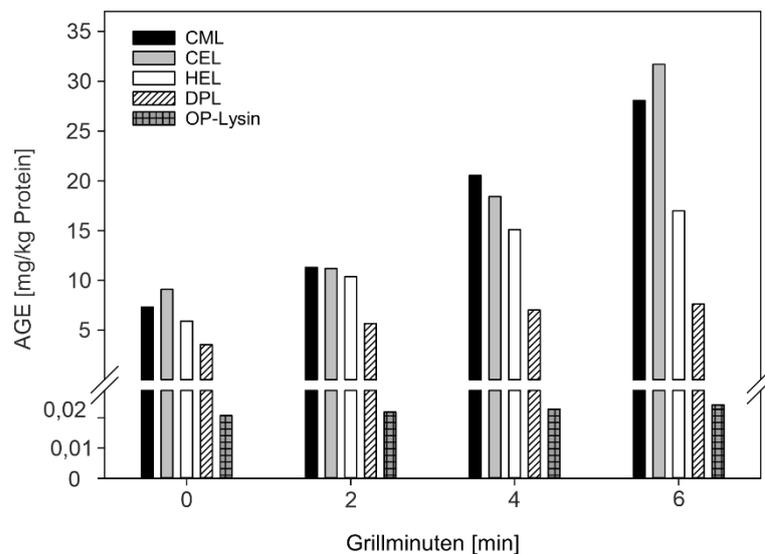


Abb. 46: Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Grillens von Rindfleischbratlingen

In rohem Hackfleisch war CEL mit 9,1 mg/kg Protein die quantitativ bedeutendste Proteinmodifikation. Der Gehalt stieg nach 6 min um den Faktor 3 auf 31,7 mg/kg Protein. Für CML konnten ähnliche Bildungsraten analysiert werden, hier erhöhte sich der Gehalt von 7,3 mg/kg Protein auf 28,0 mg/kg Protein. Ähnliche Gehalte, mit unterschiedlichen Verhältnissen von CEL:CML, werden in der Literatur beschrieben.^{211,212} Gründe hierfür sind die unterschiedliche Zubereitungsart, Vorbehandlungen und die Art des erhitzten Fleisches. In Schweinefleisch konnte MGX als dominanteste Vorläuferstruktur identifiziert werden.¹²¹ Darüber hinaus wurden die proteingebundenen Vorläuferstrukturen HEL und DPL quantifiziert. Für beide Strukturen konnte ein konstanter Anstieg während des Grillens verzeichnet werden, die detektierten Gehalte von HEL waren im Vergleich zu DPL doppelt so hoch.

Überraschenderweise konnte keine signifikante Zunahme von OP-Lysin festgestellt werden. Bereits im rohen Zustand konnten hier Gehalte um 20 µg/kg Protein bestimmt werden. Obwohl DPL nachgewiesen wurde, konnten keine quantitativ relevanten Mengen GLAP und *meta*-DLP detektiert werden, die Gehalte lagen unterhalb der BG. Ebenfalls konnten für die GA-spezifische Proteinmodifikation HOP-Lysin keine quantifizierbaren Mengen nachgewiesen werden.

Um den direkten Einfluss von Ribose auf die Bildung von AGEs zu untersuchen, wurde die Pentose in 50-fachen Überschuss, im Vergleich zur natürlich vorkommenden Konzentration, zu einer definierten Menge rohem Rinderhackfleisch dazugegeben. Die Bratlinge wurden, wie bereits beschrieben, geformt, 6 min gegrillt und mittels LC-MS/MS vermessen. Die Zugabe von Ribose hatte einen signifikanten Einfluss auf die Bildung von AGEs (Tab. 15).

Tab. 15: Gehalte ausgewählter Proteinmodifikationen in verschiedenen Bratlingen

Analyt [mg/kg Protein]	gebraten		
	roh 0^b	nativ 6^b	Zusatz D-Ribose 6^b
CML	7,3 ± 0,7	27,0 ± 1,7	55,9 ± 2,6**
CEL	9,1 ± 0,9	31,7 ± 3,0	68,1 ± 3,3**
HEL	5,9 ± 0,5	17,0 ± 1,1	57,9 ± 1,0**
DPL	3,5 ± 0,7	7,6 ± 0,4	10,3 ± 0,3*
GLAP ^a	< BG	< BG	4,4 ± 0,4
OP-Lysin ^a	22,8 ± 1,5	24,2 ± 1,2	67,6 ± 3,6**
HOP-Lysin ^a	< BG	< BG	< BG
<i>meta</i> -DLP ^a	< BG	< BG	3,2 ± 0,3

^a Gehalte in µg/kg Protein; ^b Grillminuten; statistischer Signifikanztest zwischen nativ gebratenem und mit Zusatz von D-Ribose gebratenem Fleisch: *P ≤ 0,05 und **P ≤ 0,01

Dies ist auf den Abbau der Pentose zu kurzkettigeren Carbonylen, wie z.B. GX und MGX, zurückzuführen. So verdoppelten sich die Gehalte von CEL und CML im Vergleich zum nativen Bratling. Davidek *et al.* untersuchten detailliert den Abbau von C₅-Zuckern und bewiesen mittels ¹³C-markierter Xylose, dass diese durch hydrolytische β-Dicarbonylsplaltung abgebaut werden.²¹³ Die daraus resultierenden Produkte sind Essigsäure und G3. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit zum einen durch den Anstieg von DPL und zum anderen durch die Detektion der G3-spezifischen Proteinmodifikation GLAP bestätigt werden. Darüber hinaus konnte *meta*-DLP mit einem Gehalt von 3,2 µg/kg Protein bestimmt werden. Die Gehalte von OP-Lysin verdreifachten sich im Ribose-zugesetzten Bratling auf 67,6 µg/kg Protein. Allerdings blieben die Gehalte von HOP-Lysin wieder unterhalb der BG. Zusammenfassend

zeigen diese Ergebnisse, dass Ribose in Fleisch ein wichtiges Ausgangsprodukt für Bildung von AGEs darstellt, der Gehalt an natürlich vorkommender Ribose allerdings nicht ausreicht, um Pyridinium-AGEs in quantitativ relevanten Mengen zu bilden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation befasste sich mit der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen durch reaktive Carbonylverbindungen. Die dabei auftretenden nicht-enzymatischen Carbonyl-Amin-Reaktionskaskaden werden unter dem Begriff Maillard-Reaktion zusammengefasst und führen zu strukturell vielfältigen Endprodukten, den sogenannten Advanced Glycation Endproducts (AGEs). Die Maillard-Reaktion wird mit negativen Veränderungen von Proteinen in Verbindung gebracht, da diese zum Verlust von essentiellen Aminosäuren führt und die biologische Funktionalität von Proteinen beeinträchtigt. Auf der einen Seite spielen AGEs bei der Herstellung und Verarbeitung von Lebensmitteln eine entscheidende Rolle, auf der anderen Seite werden diese *in vivo* durch metabolische Prozesse gebildet. Das Verständnis der zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen in der Modifizierung von Proteinen ist deshalb von essentieller Bedeutung. Ziel der Arbeit war es daher, in verschiedenen Modellinkubationen die mechanistische Bildung von AGEs zu klären, wobei ein besonderer Fokus auf die Strukturklasse der Pyridinium-AGEs gelegt wurde. Des Weiteren wurde die Bildung dieser Proteinmodifikationen in frittierten Kartoffelchips und gebratenem Fleisch untersucht.

In einer sechsstufigen Synthese wurde ein neuartiges Lysin-Lysin Crosslink (*meta*-DLP) synthetisiert und dessen Struktur mithilfe verschiedener NMR-Techniken und hochauflösender Massenspektrometrie eindeutig aufgeklärt. Darüber hinaus wurden in einer analogen Synthesestrategie drei weitere monovalente Pyridinium-AGEs (OP-Lysin, GLAP und HOP-Lysin) hergestellt und charakterisiert. Durch die Entwicklung einer hochsensitiven und leistungsstarken LC-MS/MS Methode, konnten diese Strukturen sicher im Spurenbereich quantifiziert werden. Zunächst konnten auf Grundlage von Modellinkubationen mit *N*^ε-geschütztem Lysin und verschiedenen α -Dicarbonylen (Glyoxal (GX) und Methylglyoxal (MGX)) bzw. α -Hydroxycarbonylen (Glycolaldehyd (GA) und Glyceraldehyd (G3)) die Bildung dieser Pyridinium-AGEs aufgeklärt werden. Definierte Versuchsbedingungen wurden durch die Verwendung eines Phosphatpuffers (0,1 M; pH = 7,4) gewährleistet und der Einfluss von Sauerstoff (aerobe vs. anaerobe Bedingungen) näher beleuchtet. Nach sieben Tagen Inkubationszeit konnten die höchsten Konzentrationen von *meta*-DLP (4,42 μ mol/mol Lysin) in der Mischinkubation GA/G3 detektiert werden, wobei die Bildung unabhängig von Sauerstoff war. Im Gegensatz dazu wurde OP-Lysin bevorzugt in anaeroben Inkubationen gebildet (aerobe GA-Inkubation: 11,6 μ mol/mol Lysin vs. anaerobe GA-Inkubation: 25,2 μ mol/mol Lysin). Desweiteren ließ die Quantifizierung von *meta*-DLP und OP-Lysin in diesen Inkubationen auf einen neuartigen, alternativen Bildungsmechanismus schließen, wobei

GA und GX involviert sind. Diesen Erkenntnissen folgend, wurden Modellinkubationen mit $1\text{-}^{13}\text{C}$ -markierten GA durchgeführt und ein Reaktionsweg postuliert, indem zwei Moleküle GA und ein Molekül GX unter Freisetzung von Ameisensäure zur Bildung von *meta*-DLP bzw. OP-Lysin führen. Darüber hinaus konnten GLAP und HOP-Lysin als G3- bzw. GA-spezifische AGEs bestätigt werden. Insgesamt zeigten diese Ergebnisse, dass α -Hydroxycarbonylverbindungen eine zentrale Rolle bei der Bildung von Pyridinium-AGEs einnehmen. Neben kurzkettigen Carbonylen wurden zudem längerkettige Kohlenhydrate als potentielle Vorläuferstrukturen von Pyridinium-AGEs identifiziert. Gleichmaßen wurden Modellinkubationen unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die quantitativ bedeutsamsten Mengen wurden in anaeroben Inkubationen mit D-Ribose detektiert (OP-Lysin: $23,9\ \mu\text{mol/mol}$ Lysin; *meta*-DLP: $0,82\ \mu\text{mol/mol}$ Lysin und GLAP: $0,14\ \mu\text{mol/mol}$ Lysin). Darüber hinaus konnten in diesen Modellinkubationen Einblicke in das Redoxsystem GX/GA gegeben werden. Die Reduktion der entsprechenden Imine durch Natriumborbordeuterid führte für GA zu einfach deuteriertem N^6 -Hydroxyethyllysin (HEL-1D) und für GX zu zweifach deuteriertem N^6 -Hydroxyethyllysin (HEL-2D). Im Vergleich zur aeroben D-Ribose-Inkubation lag das Verhältnis in der anaeroben Inkubation deutlich zugunsten von GA, was die bevorzugte Bildung der Pyridinium-AGEs erklärte. Eine Ausnahme bildete HOP-Lysin, hier lieferten Inkubationen mit C_4 -Zuckern im Vergleich zur Inkubation mit D-Ribose bis zu zehnfach höhere Mengen.

Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen ergaben, dass die synthetisierten Pyridinium-AGEs fluoreszierende Strukturen darstellen. In diesem Zusammenhang wurde in weiteren Modellversuchen die photochemische Bildung von Singulett-Sauerstoff näher untersucht. Dazu wurden *meta*-DLP und OP-Lysin in Gegenwart eines wasserlöslichen Naphthalinderivates (NDP) mit einer Quecksilberdampfampe bestrahlt. Der anschließende Nachweis des korrespondierenden Endoperoxids (NDPO_2) mittels LC-MS/MS bewies, dass fluoreszierende Pyridinium-AGEs Photosensibilisatoren darstellen.

Gleichzeitig wurde in kommerziellen Kartoffelchips ein breites AGE-Spektrum quantifiziert. Neben säurestabilen Proteinmodifikationen, die nach einer salzsauren Hydrolyse quantifiziert wurden, konnten auch säurelabile Strukturen nach einer enzymatischen Hydrolyse in isolierten Proteinfractionen erfasst werden. Hierbei stellte sich heraus, dass die MGX-AGEs (CEL und MOLD) die GX-Pendants (CML und GOLD) um den Faktor 1,4-3 überstiegen. Nichtsdestotrotz konnte N^6 -Formyllysin als quantitativ bedeutendste Proteinmodifikation mit einem durchschnittlichen Gehalt von $950\ \mu\text{g}/100\ \text{g}$ quantifiziert werden. Durch kollisionsinduzierte Dissoziationsexperimente konnten erstmalig *meta*-DLP und OP-Lysin in prozessierten Lebensmitteln nachgewiesen und quantifiziert werden. Die durchschnittlichen

Gehalte in kommerziellen Kartoffelchips lagen für *meta*-DLP bei 0,12 µg/100 g und für OP-Lysin bei 6,9 µg/100 g. Während GLAP in einem ähnlichen Konzentrationsbereich detektiert wurde, konnte die GA-spezifische Proteinmodifikation HOP-Lysin nicht quantifiziert werden. Weiterführende Experimente mit steigender Frittierdauer von Kartoffelscheiben lieferten genauere Einblicke in die Bildung von AGEs und deren Vorläuferstrukturen. Wie bereits oben angesprochen ließ die Detektion von HEL-1D und HEL-2D Rückschlüsse auf proteingebundenes GA bzw. GX schließen, wobei mit fortschreitender Frittierdauer das Verhältnis deutlich zugunsten von GX verschoben wurde. Abschließend wurde die AGE-Bildung in gegrillten Rindfleischbratlingen betrachtet, wobei D-Ribose als potente Vorläuferstruktur im Fokus stand. Allerdings reichten die natürlich vorkommenden Gehalte des C₅-Zuckers nicht aus, um Pyridinium-AGEs in quantitativ relevanten Mengen zu bilden. Die Zugabe von D-Ribose zu den nativen Rindfleischbratlingen führte zu signifikant erhöhten AGE-Gehalten.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Dissertation das bisherige Wissen zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen erweitert werden. Durch quantitative Betrachtungen wurden Einblicke in die zugrunde liegenden Bildungsmechanismen von Pyridinium-AGEs gewonnen. Darüber hinaus wurde die Strukturklasse der Pyridinium-AGEs als Auslöser von oxidativen Stress identifiziert und können somit *in vivo* einen Einfluss auf die Entstehung von Katarakt besitzen. Zudem konnte diese Strukturklasse in thermisch behandelten Lebensmitteln quantifiziert werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 Synthesen

6.1.1 Darstellung von *N*^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin-*tert*-butylester

2,0 g (5,26 mmol) *N*^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin wurden zusammen mit 330 mg (2,70 mmol) 4-Dimethylaminopyridin in 10 mL *tert*-Butanol gelöst. Unter Rühren bei Raumtemperatur wurden 1222 mg (5,60 mmol; 1286 µl) Di-*tert*-butyldicarbonat hinzugegeben und der Reaktionsansatz 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abzug des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurde das Produkt in 2 mL Hexan/Aceton (3:1; v/v) gelöst und säulenchromatographisch aufgereinigt. Dazu wurden 75 g Kieselgel in eine Säule (40 x 5 cm) bis zu einer Füllhöhe von 15 cm gefüllt, als Fließmittel diente Hexan/Aceton (3:1; v/v). Die Detektion der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels Ninhydrin-Sprühreagenz. Fraktionen mit einem *R*_F-Wert von 0,34 wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde nach dem Trocknen im Hochvakuum mit einer Ausbeute von 92% (2,11 g; 4,84 mmol) als farbloses Öl erhalten.

6.1.2 Darstellung von *N*^α-Boc-Lysin-*tert*-butylester

N^α-Boc-*N*^ε-Cbz-Lysin-*tert*-butylester wurde mit einer Spatelspitze Palladium auf Aktivkohle in 10 mL Methanol/Dichlormethan (1:1; v/v) gelöst. Unter intensiven Rühren wurde bei Raumtemperatur für 4 h Wasserstoff in die Lösung eingeleitet und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt. Als Fließmittel wurde Methanol/Dichlormethan/Triethylamin (7/2,9/0,1; v/v/v) verwendet und mittels Ninhydrin-Sprühreagenz detektiert. Nach erfolgter Reaktion wurde über Celite filtriert, die Fraktionen mit einem *R*_F-Wert von 0,24 vereinigt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde nach dem Trocknen im Hochvakuum als braunes Öl mit einer Ausbeute von 86% (1,25 g; 4,16 mmol) erhalten.

6.1.3 Darstellung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc) Amino]-6-hydroxyhexansäure

908 mg (3,0 mmol) *N*^α-Boc-Lysin-*tert*-butylester wurden in 5 mL Wasser/Ethanol (9:1; v/v) gelöst. Der pH-Wert wurde mit 4 M NaOH auf 9,5 eingestellt und die Lösung auf 60 °C erhitzt. 1430 mg (4,80 mmol; 1,6 eq.) Natrium-Nitroprussid wurden portionsweise über 30 min zum Ansatz hinzugegeben und die Reaktion für zusätzliche 5 h erhitzt und gerührt. Der pH-Wert wurde über die gesamte Synthesedauer durch Zugabe von 4 M NaOH, zwischen 9 und 10

gehalten. Der Umsatz wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt, als Laufmittel diente Ethylacetat/Hexan (2:3; v/v). Nach Reaktionsende wurde der Ansatz auf Raumtemperatur gekühlt und nach Entfernung des Ethanols im Vakuum mit Ethylacetat ausgeschüttelt (3 x 25 mL). Die organischen Phasen wurden vereinigt und mit Ethylacetat über Celite filtriert. Anschließend erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung über Kieselgel mit Ethylacetat/Hexan (1:1; v/v). Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,33 wurden vereinigt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Trocknung im Hochvakuum bis zur Massenkonstanz wurde das Produkt mit einer Ausbeute von 35% (318 mg; 1,05 mmol) als gelbes Öl erhalten.

6.1.4 Darstellung von *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc) Amino]-6-iodhexansäure

393 mg (1,5 mmol; 1,5 eq.) Triphenylphosphan, 109 mg (1,6 mmol; 1,6 eq.) Imidazol und 380 mg (1,5 mmol; 1,5 eq.) Iod wurden nacheinander zu einer Lösung von 303 mg (1,0 mmol; 1,0 eq.) *tert*-Butyl-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-hydroxyhexansäure in wasserfreiem Tetrahydrofuran (THF) gegeben. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur unter Argonatmosphäre 4 h gerührt und der Umsatz dünnschichtchromatographisch verfolgt. Als Laufmittel diente Hexan/Ethylacetat (9:1; v/v), detektiert wurde mittels Ninhydrin-Sprühreagenz. Im Anschluss erfolgte eine säulenchromatographische Aufreinigung mittels Kieselgel. Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,33 wurden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde das Produkt als bräunlich viskoses Öl mit einer Ausbeute von 50% (207 mg; 0,5 mmol) erhalten.

6.1.5 Darstellung von 3-(Boc-Amino)-Pyridin

498 mg 3-Aminopyridin (5,3 mmol) wurden in 10 mL *tert*-Butanol gelöst. Anschließend wurden 1222 mg (5,60 mmol; 1286 μ l) Di-*tert*-butyldicarbonat hinzugegeben und der Reaktionsansatz 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Fließmittel diente Hexan/Ethylacetat (7/3; v/v) und die Detektion der gesammelten Fraktionen erfolgte mittels Ninhydrin-Sprühreagenz. Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,25 wurden vereint. Nach Trocknen im Hochvakuum wurde das Produkt als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 90% (926 mg; 4,77 mmol) erhalten.

6.1.6 Darstellung von 4-(Boc-Amino)-Pyridin

Die Darstellung erfolgte analog zu Punkt 6.1.5, wobei hier 503 mg 4-Aminopyridin eingesetzt wurden. Die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte mittels Hexan/Ethylacetat (2/1; v/v), die Detektion der gesammelten Fraktionen mittels Ninhydrin-Sprühreagenz. Fraktionen

mit einem R_f -Wert von 0,44 wurden vereint. Nach der Trocknung im Hochvakuum bis zur Massenkonzanz wurde das Produkt als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 89% (915 mg; 4,72 mmol) erhalten.

6.1.7 Darstellung von 3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridin

230 mg (1,5 mmol) 5-Hydroxynicotinsäuremethylester wurden in 5 mL wasserfreiem THF gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Nach portionsweiser Zugabe von 230 mg (6,06 mmol) Lithiumaluminiumhydrid wurde das Eisbad entfernt und der Reaktionsansatz für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit 5 mL 3 N HCl angesäuert, 1 h gerührt und das Lösungsmittel anschließend im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Acetonitril aufgenommen und säulenchromatographisch aufgereinigt. Als Fließmittel diente Acetonitril/Methanol (9:1; v/v). Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,29 wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach der Trocknung im Hochvakuum wurde das Produkt als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 70% (131,4 mg; 1,05 mmol) gewonnen.

6.1.8 Darstellung von 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridin

Für die Synthese von 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridin wurden 232 mg (1,5 mmol) 3-Hydroxynicotinsäuremethylester in 5 mL wasserfreiem THF gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Die Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid und anschließende säulenchromatographische Trennung erfolgte wie unter 6.1.7 beschrieben. Aus den vereinigten Fraktionen wird nach Entfernung des Lösemittels und Lyophilisation das Produkt als gelbes Öl mit einer Ausbeute von 70% (131,0 mg; 1,05 mmol) erhalten.

6.1.9 Darstellung von *meta*-DLP

97,1 mg (0,5 mmol; 0,5 eq.) 3-(Boc-Amino)-Pyridin und 69,2 mg (0,5 mmol; 0,5 eq.) Kaliumcarbonat wurden unter intensivem Rühren in 10 mL 1,4-Dioxan gegeben und auf 100 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurde eine Lösung aus 305,4 mg (1,0 mmol; 1 eq.) *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-iodhexansäure, gelöst in 5 mL 1,4-Dioxan, tropfenweise dazugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 12 h bei 100 °C unter Rückfluss erhitzt und anschließend das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt, als Lösungsmittel diente Aceton/Ethylacetat (4:1; v/v). Die entsprechenden Fraktionen ($R_f = 0,29$ in Aceton/Ethylacetat (4:1; v/v, Detektion mit Ninhydrin-Sprühreagenz)) wurden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton/6 N Salzsäure (HCl) (1:1; v/v) gelöst, für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss im Vakuum eingengt. Die chromatographische

Aufreinigung erfolgte mittels präparativer HPLC (VYDAC 218TP1022, 250 × 20 mm, RP18, 87 10 µm; Laufmittel: isokratisch; Wasser/Methanol 75:25 + 1,2 mL/L Heptafluorbuttersäure (HFBA); Flussrate: 10 mL/L) aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden durch eine Nachsäulenderivatisierung mit OPA detektiert (Fluoreszenzdetektor (FLD): Ex= 340 nm; Em= 455 nm). Die entsprechenden Fraktionen ($t_R=28-36$ min) wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurde das Produkt (*meta*-DLP·4 HFBA) bis zur Massenkonstanz wiederholt lyophilisiert und konnte als farbloses amorphes Material mit einer Ausbeute von 4% (25,0 mg, 0,020 mmol) gewonnen werden.

6.1.10 Darstellung von *para*-DLP

Für die Darstellung von *para*-DLP wurden 98,0 mg (0,5 mmol; 0,5 eq.) 4-(Boc-Amino)-Pyridin eingewogen, mit 68,5 mg (0,5 mmol; 0,5 eq.) Kaliumcarbonat und 305,0 mg (1,0 mmol; 1 eq.) *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-iodhexansäure umgesetzt. Die Alkylierung und anschließende säulenchromatographische Aufreinigung erfolgten analog zu Punkt 6.1.9. Die entsprechenden Fraktionen ($R_f = 0,32$ in Aceton/Ethylacetat (4:1; v/v, Detektion mit Ninhydrin-Sprühreagenz)) wurden gesammelt und im Anschluss das Lösungsmittel entfernt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte wie unter 6.1.9 beschrieben. Die Aufreinigung des Rückstands erfolgte mittels präparativer HPLC (Laufmittel: isokratisch; Wasser/Methanol 72:28 + 1,2 mL/L HFBA; Flussrate: 10 mL/min; FLD: Ex = 340 nm; Em = 455 nm). Nach der Trocknung im Hochvakuum konnte *para*-DLP·4 HFBA als farbloses amorphes Material mit einer Ausbeute von 6% (38,2 mg; 0,031 mmol) gewonnen werden.

6.1.11 Darstellung von OP-Lysin

47,5 mg (0,5 mmol; 2 eq.) 3-Hydroxypyridin wurden in 5 mL wasserfreiem 1,4-Dioxan gelöst und auf 100 °C unter Rückfluss erhitzt. Zu der Lösung wurden 103,3 mg (0,25 mmol) *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-iodhexansäure portionsweise über einen Zeitraum von 30 min hinzugegeben und der Ansatz für weitere 12 h unter Rückfluss gerührt. Das Produkt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt, als Laufmittel diente Acetonitril/Wasser (4:1; v/v). Die Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,29 wurden vereinigt (Detektion: Ninhydrin-Sprühreagenz) und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Anschließend wurde das Produkt in 5 mL Wasser gelöst, mit 5 mL 6 N HCl versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Die überschüssige wässrige HCl wurde mittels Vakuumzentrifuge entfernt. Der Rückstand wurde mithilfe präparativer HPLC (Laufmittel: isokratisch; Wasser/Methanol 93:7 + 1,2 mL/L HFBA, Flussrate: 10 mL/min; FLD: Ex = 340 nm; Em = 455 nm) aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen ($t_R=30-38$ min) wurden vereinigt und das Lösungsmittel entfernt. Anschließend wurde das Produkt mehrfach lyophilisiert und OP-

Lysin-2 HFBA konnte als farbloses amorphes Material mit einer Ausbeute von 27% (44,3 mg; 0,070 mmol) gewonnen werden.

6.1.12 Darstellung von GLAP

Für die Darstellung von GLAP wurden 104,6 mg (0,5 mmol) 3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridin mit 103,7 mg (0,25 mmol) *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-iodhexansäure umgesetzt. Die Alkylierung sowie die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte analog zu Punkt 6.1.11. Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,32 (Acetonitril/Wasser (4:1; v/v)) wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppen erfolgte wie unter 6.1.11 beschrieben. Das entschützte Produkt wurde mit präparativer HPLC (Fließmittel: isokratisch; Wasser/Methanol 95:5 + 1,2 mL/L HFBA; Flussrate: 10 mL/min FLD: $E_x = 340$ nm; $E_m = 455$ nm) aufgereinigt. Die entsprechenden Fraktionen ($t_R = 31$ -38 min) wurden vereinigt und das Produkt anschließend bis zur Massenkonstanz im Hochvakuum getrocknet. GLAP-2 HFBA konnte als farbloses amorphes Material mit einer Ausbeute von 18% (30,0 mg; 0,044 mmol) gewonnen werden.

6.1.13 Darstellung von HOP-Lysin

Für die Synthese von HOP-Lysin wurden 104,1 mg (0,5 mmol) 3-Hydroxy-4-hydroxymethylpyridin mit 102,9 mg (0,25 mmol) *tert*-Boc-2-[(*tert*-Boc)-Amino]-6-iodhexansäure umgesetzt. Die Alkylierung sowie die säulenchromatographische Aufreinigung erfolgte analog zu Punkt 6.1.11. Fraktionen mit einem R_f -Wert von 0,27 (Acetonitril/Wasser (4:1; v/v)) wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die Entfernung der Boc-Schutzgruppen erfolgte wie unter 6.1.11 beschrieben. Der Rückstand wurde der präparativen HPLC zugeführt (Fließmittel: Wasser/Methanol 91:9 + 1,2 mL/L HFBA; Flussrate: 10 mL/L; FLD: $E_x = 340$ nm; $E_m = 455$ nm). Die entsprechenden Fraktionen ($t_R = 33$ -43 min) wurden vereinigt und das Produkt anschließend bis zur Massenkonstanz im Hochvakuum getrocknet. HOP-Lysin-2 HFBA konnte als farbloses amorphes Material mit einer Ausbeute von 16% (27,3 mg; 0,040 mmol) gewonnen werden.

6.1.14 Darstellung von NDPO₂

0,6 g (14,7 mmol) Natriumhydroxid, 0,2 g (2,4 mmol) Natriumhydrogencarbonat, 0,5 g (4,7 mmol) Natriumcarbonat und 2,5 g (10,3 mmol) Natriummolybdat-Dihydrat wurden in 20 mL Reinstwasser gelöst. Anschließend wurden 30 mg (0,11 mmol) Dinatrium-1,4-naphthalindipropionat (NDP) zugegeben und der Reaktionsansatz in einem Wasserbad konstant bei 20 °C gehalten. Danach wurden 2 mL Wasserstoffperoxid (30%-ige Lösung) hinzugegeben und die rotbraune Lösung bis zum Farbumschlag nach gelb für etwa 15 min

gerührt. Nach demselben Prinzip wurden vier weitere Fraktionen Wasserstoffperoxid (je 2 mL) nacheinander hinzugegeben. Nach 90 min wurde der Reaktionsansatz mit einem Eisbad auf 0 °C gekühlt und mit kalter Phosphorsäure (2 M) angesäuert (pH=2,5). Nach 5 min Zentrifugation bei 4000 g und 4 °C wurde der saure Überstand verworfen, das weiße Präzipitat in 5 mL Eiswasser resuspendiert, unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert und säurefrei gewaschen. Der Rückstand wurde in 50 mL THF (0 °C) gelöst und mit 5 g Magnesiumsulfat getrocknet. Im Anschluss wurde das Produkt filtriert und mit 7 mL (14 mmol; 2 M) Natriummethanolat versetzt. Das Präzipitat wurde bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert, mit kaltem Diethylether gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das ¹H-NMR-Spektrum zeigte, dass 48% Endoperoxid (NDPO₂) gebildet wurden und 52% auf NDP zurückzuführen waren.

6.1.15 Darstellung von *N*⁶-(2,3-Dihydroxypropyl)-Lysin

273,9 mg (1,1 mmol) *N*^α-*tert*-Boc-Lysin, 143,2 mg (1,1 mmol) Isopropylidenglyceraldehyd und 74,0 mg (1,2 mmol) Natriumcyanoborhydrid wurden in 7 mL wasserfreien Methanol gelöst und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt, als Lösungsmittel diente Aceton/Ethylacetat/Essigsäure (1:2:0,1; v/v). Die entsprechenden Fraktionen (*R*_f = 0,30) wurden gesammelt und das Lösungsmittel entfernt. Der Rückstand wurde in 3 N HCl gelöst, für 1 h bei Raumtemperatur gerührt und im Anschluss im Hochvakuum getrocknet. DPL konnte als farbloses Pulver mit einer Ausbeute von 27% (65,0 mg; 0,295 mmol) gewonnen werden.

6.2 Modellinkubationen unter aeroben Bedingungen

6.2.1 Inkubationen von kurzkettigen Carbonylen mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin

N^α-*tert*-Boc-Lysin (42 mM) wurde jeweils mit Glycolaldehyd (42 mM), Glyoxal (42 mM), Glyceraldehyd (42 mM) und einem Gemisch aus Glycolaldehyd und Glyceraldehyd (je 21 mM) in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) für sieben Tage bei 37 °C in 0,5 mL Sicherheits-Reaktionsgefäßen inkubiert. Für die quantitative Entfernung der *N*^α-*tert*-Boc-Schutzgruppe wurden Aliquote der Inkubationslösungen entnommen und mit 6 N HCl bei Raumtemperatur versetzt. Nach 30 min Reaktionszeit wurde das Lösungsmittel mittels Vakuumzentrifuge entfernt und der Rückstand in 0,05 mM HCl aufgenommen.

6.2.2 Inkubationen von Zuckern mit *N*^α-*tert*-Boc-Lysin

N^α-*tert*-Boc-Lysin (42 mM) wurde jeweils mit L-Ascorbinsäure (42 mM), D-Glucose (100 mM), D-Ribose (100 mM), L-Arabinose (100 mM), D-Xylose (100 mM), D-Threose

(100 mM), D-Erythrose (100 mM) und L-Erythrulose (100 mM) in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) für sieben Tage bei 37 °C in 0,5 mL Sicherheits-Reaktionsgefäßen inkubiert. Um die *N^α-tert-Boc*-Schutzgruppe zu entfernen, wurden Aliquote der Inkubationslösungen 1:1 (v:v) mit 6 N HCl versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Säure mittels Vakuumzentrifuge entfernt und der Rückstand in 0,05 mM HCl aufgenommen.

6.3 Modellinkubationen unter anaeroben Bedingungen

Die zuvor beschriebenen Modellinkubationen unter aeroben Bedingungen (siehe Punkt 6.2.1 und 6.2.2) wurden ebenfalls unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde der Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) mit Diethylentriaminpentaessigsäure (1 mM) versetzt, welches als chelatisierender Komplexbildner für Metall-Kationen dient. Alle Lösungen wurden für 10 min mit Helium entgast und die Inkubationsansätze vor der thermischen Behandlung mit Argon überschichtet. Die Inkubationen wurden unter Luftausschluss in 0,5 mL Sicherheits-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

6.3.1 Inkubationen mit 1-¹³C-markierten Glycolaldehyd

1-¹³C-Glycolaldehyd und Glyoxal wurden in verschiedenen Konzentrationen (40 mM/0 mM; 35,6 mM/4,4 mM; 20 mM/20 mM; 4,4 mM/35,6 mM) mit *N^α-tert-Boc*-Lysin (40 mM) unter anaeroben Bedingungen (siehe Punkt 6.3) in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) für sieben Tage bei 37 °C inkubiert. 200 µL der Inkubationslösungen wurden entnommen und mit 200 µL 6 N HCl versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Säure mittels Vakuumzentrifuge entfernt und der Rückstand in 200 µL HCl (0,05 mM) gelöst.

6.4 Bestrahlungsmodellexperiment

NDP (0,5 mM) wurde mit *meta*-DLP (1 µM) bzw. OP-Lysin (1 µM) in Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) versetzt. Die Lösungen wurden anschließend in eine Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) überführt und mit einer HBO 50 Quecksilberdampfampe (50 W, 117 Osram) für 1 h bestrahlt. Während der Bestrahlung wurde kontinuierlich Luft in die Lösung eingeblasen, die Küvette dauerhaft im Eisbad gekühlt und ein UG5 Filter (Schott, 50.8 x 50.8 mm UV optischer Bandpassfilter) verwendet. Nach der Bestrahlung wurden die Lösungen bei 0 bis 5 °C temperiert und anschließend der LC-MS/MS zugeführt.

6.5 Aufarbeitung von Kartoffelchips

6.5.1 Proteinisolierung kommerzieller Kartoffelchips

Etwa 100 g Probe wurden mittels Mörser und Pistill grob zerkleinert. Anschließend wurde diese vollständig in eine Moulinette überführt, fein zerkleinert und homogenisiert. Für die Fettextraktion wurden 10 g Probe in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 25 mL Petrolether versetzt. Nach intensivem Schütteln wurde die Suspension für 10 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend bei 20 °C und 9000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang vier Mal wiederholt. Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Proben in einer Schwingmühle für 30 s bei einer Frequenz von 30 s⁻¹ feinst zerkleinert. Es wurden 2 g entfettete Probe in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen und mit 15 mL Reinstwasser versetzt. Anschließend wurden 150 µL α-Amylase der Suspension zugeführt und diese unter wiederholtem Schütteln für 30 min bei 95 °C in einem Wasserbad temperiert. Nach einer Abkühlphase wurden 500 µL Amyloglucosidase hinzugegeben und unter Schütteln für 30 min bei 60 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Proteinfällung durch die Zugabe von 5 mL Reinstwasser und 20 mL absolutem Ethanol. Nach intensivem Schütteln wurde die Suspension für 12 h bei -23 °C tiefgefroren. Im Anschluss wurde die Probe homogenisiert, bei 4 °C und 9000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Proteinisolat wurde zwei Mal mit 15 mL Eiswasser gewaschen und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Das Proteinisolat wurde bei -23 °C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert.

6.5.2 Frittieren von Kartoffelscheiben

Für den Frittierprozess wurden Kartoffeln (1 kg) der Sorte Karelia von einem lokalen Supermarkt bezogen. Die Kartoffeln wurden unmittelbar nach Erwerb gewaschen, geschält und mithilfe eines Gemüsehobels in 1 mm dicke Scheiben geschnitten. Die Kartoffelscheiben wurden mit Reinstwasser gewaschen und deren Oberfläche anschließend abgetrocknet. 200 g Kartoffelscheiben wurden bei 160 °C für 2, 5, 8, 11 und 16 min in 2,5 L Sonnenblumenöl frittiert. Der Frittierprozess wurde dreimal mit frischen Sonnenblumenöl und Kartoffelscheiben wiederholt. Anschließend wurden die frittierten Scheiben auf einem Drahtgitter auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurden die Kartoffelscheiben mit einer Moulinette zerkleinert und nachfolgend lyophilisiert. Zur Entfettung der Probe wurden 25 ml Petrolether ergänzt, intensiv geschüttelt und homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend für 10 min im Ultraschallbad behandelt, sowie bei 20 °C, 9000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand an Lösungsmittel wurde abdekantiert und verworfen und der Vorgang vier Mal wiederholt. Anschließend wurden die Proben bei -23 °C tiefgefroren und lyophilisiert. Das Lyophilisat

wurde im nächsten Schritt in einer Schwingmühle für 30 s bei einer Frequenz von 30 s^{-1} feinst zerkleinert.

6.6 Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

In Anlehnung an die beschriebene Methode nach Jost *et al.* wurden ca. 70 mg der aufgearbeiteten Kartoffelchips in ein stickstofffreies Wägeschiffchen eingewogen und vollständig in einen Kjeldahlkolben überführt. Nach der Zugabe einer Kjeldahl-Katalysator-Tablette sowie Siedesteinen, wurde die Probe mit 25 mL konz. Schwefelsäure ($> 95\%$) versetzt und in eine Kjeldahltherm Block-Aufschlusseinheit überführt. Die Probe wurde auf $370 \text{ }^\circ\text{C}$ für 90 min erhitzt und bis zum Farbumschlag der Lösung nach grün umgesetzt. Nach einer Abkühlphase wurde der Kjeldahlkolben mit der Probe in ein Wasserdampf-Destillationssystem überführt. Als Vorlage für die Destillation dienten 20 mL 0,1 N Schwefelsäure, welche mit sieben Tropfen Tashiro-Indikator versetzt wurden. Für die Destillation wurde 32% -ige Natronlauge verwendet. Das Destillat wurde anschließend mit 0,1 N Natronlauge rücktitriert, wobei der Farbwechsel von violett nach grün als Umschlagspunkt diente. Als Referenz wurde ein Reagenzienblindwert analog mitgeführt. Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde im Rahmen der Berechnung der Referenzfaktor 6,25 für Getreideprodukte angewendet.

6.7 Proteinhydrolyse

Die aufgearbeiteten Kartoffelchips wurden so in ein geeignetes Sicherheits-Mikroreaktionsgefäß eingewogen, dass 9 mg Reinprotein enthalten waren. Anschließend wurden 1,5 mL PBS-Puffer zugegeben und in einer Schwingmühle für 30 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} homogenisiert. Von dieser Suspension wurden Aliquote ($3 \times 400 \mu\text{L}$) in separate Wheaton-Röhrchen überführt, mit je $100 \mu\text{L}$ Natriumborhydrid-Lösung ($15,0 \text{ g/mL}$) versetzt und homogenisiert. Für die Bestimmung von Furosin wurde auf den Reduktionsschritt verzichtet und für die Bestimmung von HEL-1D und HEL-2D wurde eine Natriumbordeuterid-Lösung ($15,0 \text{ g/mL}$) verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde wurden die Proben mittels Vakuumzentrifuge bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Trockene eingeengt.

6.7.1 Saure Proteinhydrolyse

Im Anschluss an Punkt 6.7 wurde der Rückstand in $800 \mu\text{L}$ 6 N HCl aufgenommen und homogenisiert. Danach wurde der Gasraum des Wheaton-Röhrchens für 30 s mit Argon gesättigt und mit Schraubkappen handfest verschlossen. Die Probe wurde nachfolgend für 20 h bei $110 \text{ }^\circ\text{C}$ in einem Trockenschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Wheaton-Röhrchen auf

Raumtemperatur abgekühlt und die Salzsäure mittels Vakuumzentrifuge vollständig entfernt. Der Rückstand wurde in 492 μL 0,05 mM HCl aufgenommen und homogenisiert. Zur Entfernung von Aschepartikeln wurde die Lösung in einem Spin X- Filter überführt und bei 20 °C und 13200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde im Anschluss der LC-MS/MS zugeführt.

6.7.2 Enzymatische Proteinhydrolyse

Für die enzymatische Hydrolyse wurden die Proteinisolate in ein geeignetes Sicherheits-Mikroreaktionsgefäß so eingewogen, dass 9 mg Reinprotein enthalten waren. Anschließend wurden 3 mL PBS-Puffer zugegeben und in einer Schwingmühle für 30 min bei einer Frequenz von 30 s^{-1} homogenisiert. In ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß wurde ein Thymolkristall vorgelegt und 500 μL Proteinlösung zugegeben. Anschließend wurde der Gasraum 30 s mit Argon gesättigt und das Reaktionsgefäß fest verschlossen. Im Abstand von 24 Stunden wurde zweimal 29,4 μL Papain (0,5 U) zugegeben. Es folgte im gleichen Zeitabstand zweimal die Zugabe von 29,4 μL Endopeptidase Pronase E (0,3 U), die Zugabe von 14,3 μL einer Leucin-Aminopeptidase Suspension (1 U) sowie 41,7 μL Carboxypeptidase Y (0,95 U). Nach jeder Enzymzugabe wurde die Lösung homogenisiert und 24 Stunden bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Nach der enzymatischen Hydrolyse wurde die Lösung durch einen MWCO 3000 Filter filtriert (13200 rpm, 15 min, 20 °C) und anschließend der LC-MS/MS zugeführt.

6.8 Quantifizierung von AGEs mittels LC-MS/MS

Die Quantifizierung der Proteinmodifikationen in den Modellinkubationen, sowie in den Hydrolysaten basierte auf der Methode der Standardaddition. Zur Berechnung der Bestimmungsgrenze wurde das Signal-Rauschverhältnis herangezogen (9:1), für die Berechnung der Nachweisgrenze betrug das Signal-Rauschverhältnis 3:1. Die optimierten massenspektrometrischen Parameter der Analyten sowie die chromatographische Trennung sind im Anhang beschrieben.

6.9 Anreicherung und CID-Spektren der Pyridinium-AGEs

30 μL der sauren Proteinhydrolysate wurden mehrfach ($n = 10$) in ein analytisches HPLC System injiziert. Die chromatographischen Methoden zur Aufreinigung der Strukturen sind im Anhang beschrieben. Entsprechende Fraktionen (GLAP $t_R = 24,0$ min; OP-Lysin $t_R = 26,2$ min und *meta*-DLP $t_R = 25,7$ min.) wurden gesammelt, vereinigt, das Lösungsmittel mittels

Vakuumzentrifuge entfernt und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Fraktionen wurden in Reinstwasser resuspendiert und anschließend der LC-MS/MS zugeführt. Für die Aufnahme der CID-Spektren wurden für die einzelnen Strukturen unterschiedliche „Declustering“-Potentiale (DP), Kollisionsenergien (CE) und Kollisionszellen-Austrittspotenziale (CXP) verwendet. Zudem wurden CE und CXP den Massenbereichen (m/z) für eine optimale Fragmentierung angepasst: GLAP: 75 eV (DP); (m/z (CE/CXP); 50–149 (30 eV/10 V); 150–255 (25 eV/14 V)). OP-Lysin: 60 eV (DP); (m/z (CE/CXP); 50–149 (30 eV/9 V); 150–255 (25 eV/12 V)). *meta*-DLP: 75 eV (DP) (m/z (CE/CXP); 50–149 (50 eV/7 V); 150–299 (40 eV/10 V); 300–350 (30 eV/13 V)).

6.10 Aufarbeitung von Rindfleischbratlingen

6.10.1 Herstellung der Bratlinge

3×400 g frisches Rinderhackfleisch wurden von einem regionalen Supermarkt bezogen und vereinigt. Die Bratlinge (Ø 8 cm, Dicke 1,5 cm) wurden aus 130 g Rinderhackfleisch geformt und anschließend für 2, 4 und 6 min in einem Kontaktgrill bei 230 °C von beiden Seiten gegrillt. Die Oberfläche des Kontaktgrills wurde mit einem Infrarotthermometer überprüft. Anschließend wurden die Bratlinge auf Raumtemperatur gekühlt, in einer Moulinette zerkleinert und lyophilisiert. Für die Entfettung wurden die Proben mit Petrolether versetzt, 15 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend bei 20 °C und 8000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Extraktionsschritt fünfmal wiederholt. Die entfetteten und getrockneten Proben wurden nachfolgend einer direkten Säurehydrolyse, wie in Punkt 6.7.3 beschrieben, unterworfen.

6.10.2 Quantifizierung von D-Ribose

500 mg wasser- und fettfreies rohes Rinderhackfleisch wurde in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit 5,5 mL Wasser/MeOH (81:19, v/v) versetzt und mit einem Hochleistungs-Dispergiergerät (Ultra-Turrax) homogenisiert. Die Proteine wurden durch die Zugabe von 1 mL 50% (w/w) Trichloressigsäure gefällt. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (8000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand spritzenfiltriert (0,45 µm, Cellulose-Acetat). Das erhaltene Filtrat wurde gemäß Rakete *et al.* derivatisiert. Dazu wurden 150 µL Filtrat mit 100 µL 1-Naphthylamin-Lösung (0,2 M in Dimethylsulfoxid/15% Essigsäure 1:1, v/v) und 500 µL Natriumcyanoborhydrid-Lösung (1,0 M in Dimethylsulfoxid) für 16 h bei Raumtemperatur inkubiert und mittels HPLC-FLD vermessen.

6.10.3 Zugabe von reduzierenden Zuckern

130 mg D-Ribose wurden zu 165 g rohen, gehackten Rindfleisch gegeben und in einer Moulinette homogenisiert. Die Bratlinge wurden anschließend, wie in Punkt 6.10.1 beschrieben, geformt, gegrillt (6 min), entfettet und lyophilisiert.

7 Puffer und Lösungen

7.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (10 mM, 1 mM NaCl, pH 7,4)

Zur Herstellung von einem Liter phosphatgepuffertes Salzlösung wurden 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 0,30 g Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat und 8,77 g Natriumchlorid in ein Becherglas eingewogen und in ca. 900 mL Reinstwasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit verdünnter Natronlauge bzw. Phosphorsäure auf pH 7,4 eingestellt. Nach Überführung in einen 1000 mL-Messkolben wurde mit Reinstwasser zur Marke aufgefüllt.

7.2 Phosphatpuffer (aerob, 0,2 M, pH 7,4)

3,752 g Dikaliumhydrogenphosphat und 0,484 g Kaliumdihydrogenphosphat wurden in ca. 80 mL Reinstwasser gelöst. Mit Phosphorsäure bzw. Kaliumhydroxidlösung wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und mit Reinstwasser auf 100 mL aufgefüllt.

7.3 Phosphatpuffer (anaerob, 0,2 M, pH 7,4)

Die Herstellung erfolgte analog zu 7.2 mit Zusatz von 78 mg Diethylentriaminpentaessigsäure. Nach der Einstellung des pH-Wertes wurde die Lösung mit Helium entgast und mit Argon überschichtet.

7.4 OPA-Derivatisierungsreagenz

800 mg OPA wurden in 10 mL Ethanol versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Für die Herstellung des Boratpuffers wurden 24,73 g Borsäure in 800 mL Wasser gelöst und mit Kaliumhydroxidlösung (22 g/100 mL) auf einen pH-Wert von 9,7 eingestellt. Anschließend wurde das gelöste OPA hinzugegeben und die Lösung auf 1 L aufgefüllt. In eine Saugflasche wurde Brij vorgelegt und das Derivatisierungsreagenz durch einen 0,45 µm Celluloseacetat-Membranfilter filtriert. Nach der Zugabe von 2 mL 2-Mercaptoethanol wurde solange gerührt, bis sich Brij vollständig gelöst hatte.

8 Chemikalien und Geräte

8.1 Chemikalien

Tab. 16: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Reinheit	Hersteller	CAS-Nummer
3-Hydroxynicotinsäuremethylester	98%	Sigma	135034-10-5
4-Dimethylaminopyridin	99%	Sigma	1122-58-3
5-Hydroxynicotinsäuremethylester	97%	Sigma	30766-22-4
Amyloglucosidase-Lösung von <i>Aspergillus niger</i>	≥ 260 U/mL	Sigma	9032-08-0
Bromthymolblau Natriumsalz	-	Roth	76-59-5
Celite (0.02-0.1 mm)	-	Merck	68855-54-9
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	≥ 99,5%	Roth	10028-24-7
Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	≥ 99%	Sigma	24424-99-5
Heptafluorbuttersäure	99%	Acros Organics	375-22-4
hitze stabile α -Amylase-Lösung von <i>Bacillus licheniformis</i> , Termamyl 120 L, Type L	120 KNU-T/g	Novozymes	9000-85-5
Kieselgel-60 (0,03 - 0,2 mm)	-	Roth	7631-86-9
Kjeldahl-Tabletten (quecksilber- und selenfrei)	5 g/Tablette	Roth	-
Lithiumaluminiumhydrid	95%	Sigma	16853-85-3
Methylenblau	-	Roth	7220-79-3
Natriumbordeuterid	98% deuteriert	Sigma	15681-89-7
Natriumborhydrid	99%	Sigma	16940-66-2
Natriumdihydrogenphosphat- Dihydrat	≥ 99%	Roth	7558-80-7
Natriumhydroxid-Plätzchen	99,4%	Fisher Chemical	1310-73-2
Natrium-Nitroprussid-Dihydrat	≥ 99%	Sigma	13755-38-9
Natronlauge	1 mol/L (1 N)	Grüssing	1310-73-2
Natronlauge	32% reinst.	Grüssing	1310-73-2
<i>n</i> -Hexan	≥ 99%	Roth	110-54-3
<i>N</i> ^α -Boc- <i>N</i> ^ε -Cbz-Lysin	99%	Sigma	2389-45-9
<i>o</i> -Phthaldialdehyd	97%	Sigma	643-79-8
Oxalsäure-Dihydrat	-	Merck	6153-56-6
Palladium auf Aktivkohle	10% Pd Basis	Sigma	7440-05-3
Triphenylphosphan	≥ 95%	Sigma	603-35-0
Wasserstoff	≥ 99,99999%	Linde	1333-74-0

8.2 Geräte

8.2.1 LC-MS/MS

Tab. 17: Geräteparameter LC-MS/MS

Parameter	
Säule	Waters Xselect HSS T3; 5 µm; 250 x 3,0 mm
Massenspektrometer	Applied Biosystems MDS Sciex 4000 Q Trap
Pumpe	Jasco PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump
Entgaser	Jasco DG-2080-54 4-Line Degasser
Gradientenmischer	Jasco LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit
Injektor	Jasco AS-2057 Plus Intelligent Sampler

8.2.2 HPLC-FLD

Tab. 18: Geräteparameter HPLC-FLD

Parameter	
Säule	VYDAC 218TP54, 250 × 4.6 mm, RP18, 5 µm Eurosphere-100, 250 mm × 30 mm, RP18, 5 µm
Detektor	Jasco, FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detector
Pumpe	Jasco, PU-2080 Plus Intelligent HPLC-Pump
Entgaser	Jasco, DG-2080-54 4 Line Degasser
Gradientenmischer	Jasco, LG-2080 Plus Quaternary Gradient Unit
Injektor	Jasco, AS-2055 Plus Intelligent Sampler

8.2.3 Präparative HPLC

Tab. 19: Geräteparameter präparative HPLC

Parameter	
Säule	VYDAC 218TP1022, 250 × 20 mm, RP18, 10 µm
Detektor	Gynotek, Fluorescence Spectromonitor RF-530
Pumpe	Besta, HD 2-200/55052 Serie 99/213
Derivatisierungspumpe	Kontron Instruments, HPLC PUMP 420
Entgaser	Jasco, DG-2080-54 4 Line Degasser
Gradientenmischer	Techlab, Niederdruck-Mischkammer S/N:21-0106-022
Injektor	Jasco, AS-2055 Plus Intelligent Sampler
Schreiber	Servogor 220

8.2.4 Sonstige Geräte

Tab. 20: Geräteparameter sonstiger Geräte

Geräte	Hersteller	Modell
Elektrogrill	Tefal	Optigrill GC705D
Infrarotthermometer	TFA Dostmann	RAY 31.1136
Kjeldatherm Block-Aufschlusseinheit	Gerhardt	KT 8s
Absaugsystem	Gerhardt	TURBOSOG-Zentrifugalsaugwascher
Wasserdampf-Destillationssystem	Gerhardt	VAP 300
Mikrowaage	sartorius	Acculab MC 5
Moulinette	moulinette Electronic	Moulinex Typ 899
pH-Meter	Knick	pH-Meter 766 Calimatic
Reinstwasseranlage	Siemens	Ultra Clear
Schwingmühle	Retsch	MM 400
Trocken- und Wärmeschrank mit Umluft	Binder	FD 53
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex RK 514 BH
Vakuumentrifuge	Thermo Scientific	Savant SPD121P-230 SpeedVac Concentrator
Kühlfalle	Thermo Scientific	Savant RVT400 Refrigerated Vapor Trap
Pumpe	vacuubrand	Chemistry Hybrid Pump RC6
Quecksilberdampfampe	Osram	HBO, 50 W
Zentrifugen	Thermo Scientific eppendorf	Heraeus Megafuge 8R Centrifuge R- 134a Centrifuge 5415R

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Initialphase der Maillard-Reaktion.....	3
Abb. 2: Bildung von Desoxyosonen	4
Abb. 3: Reaktive Carbonylverbindungen.....	5
Abb. 4: Abbauwege von Ascorbinsäure nach Smuda <i>et al.</i> ⁴⁰	6
Abb. 5: Übersicht von monovalenten- und bivalenten Proteinmodifikationen.....	8
Abb. 6: Bildung monovalenter Arginin-Modifikationen	9
Abb. 7: Überblick über mono- und bivalente Pyridinium-AGEs.....	10
Abb. 8: Postulierter Bildungsmechanismus von GLAP.....	11
Abb. 9: Bildungsmechanismus von HOP-Lysin	12
Abb. 10: Postulierter Bildungsmechanismus von OP-Lysin.....	13
Abb. 11: Anregung und mögliche Relaxationswege eines Photosensibilisators ⁸⁹	14
Abb. 12: Strecker-Abbau ¹⁰³	18
Abb. 13: Wärme- und Massentransfer beim Frittiervorgang nach Gertz <i>et al.</i> ¹²⁸	19
Abb. 14: Bildungsweg von Pyrrolin und 5-Hydroxymethylfurfural	22
Abb. 15: Überblick Synthesestrategie	25
Abb. 16: Darstellung von <i>N</i> ^α -Boc- <i>N</i> ^ε -Cbz-Lysin- <i>tert</i> -butylester	26
Abb. 17: Darstellung von <i>N</i> ^α -Boc-Lysin- <i>tert</i> -butylester	27
Abb. 18: Darstellung von <i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc) Amino]-6-hydroxyhexansäure.....	27
Abb. 19: Darstellung von <i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc) Amino]-6-iodhexansäure.....	28
Abb. 20: Modellsynthesen bivalenter Pyridiniumstrukturen	28
Abb. 21: Darstellung von <i>meta</i> - und <i>para</i> -DLP.....	29
Abb. 22: Darstellung von OP-Lysin, GLAP, HOP-Lysin.....	30
Abb. 23: UV-Spektren von <i>meta</i> -DLP (durchgezogene Linie) und <i>para</i> -DLP (gestrichelte Linie). (A) in 100 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4 und (B) berechnete Spektren mittels zeitabhängiger Dichtefunktionaltheorie ($\sigma = 0,4$ eV).....	32
Abb. 24: Emissionsspektrum von <i>meta</i> -DLP bei einer Anregungswellenlänge von 345 nm, pH = 7,4.....	33
Abb. 25: UV-Spektrum von OP-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 (durchgezogene Linie) und in 0,1% Trifluoressigsäure, pH 2,0 (gestrichelte Linie)	34
Abb. 26: Emissionsspektrum von OP-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7,4 (durchgezogene Linie), Anregungswellenlänge von 288 nm und in 0,1%	

Trifluoressigsäure, pH 2,0 (gestrichelte Linie), Anregungswellenlänge von 320 nm.....	35
Abb. 27: HPLC-FLD Chromatogramm der synthetisierten monovalenten Pyridinium-AGEs vor (schwarze Linie) und nach 24-stündiger saurer Hydrolyse (blaue Linie)	36
Abb. 28: HPLC-FLD Chromatogramm der synthetisierten bivalenten Pyridinium-AGEs vor (schwarze Linie) und nach 24-stündiger saurer Hydrolyse (blaue Linie).....	36
Abb. 29: Einfluss von GX auf das Isotopenverhältnis von (A) <i>meta</i> -DLP und (B) OP-Lysin in Modellinkubationen mit <i>N</i> ^α - <i>tert</i> -Boc-Lysin und verschiedenen Konzentrationen von 1- ¹³ C-GA und GX (schwarze Balken, 40 mM/0 mM); rote Balken, 35,6 mM/4,4 mM; blaue Balken, 20 mM/20 mM; graue Balken, 4,6 mM/35,6 mM)	41
Abb. 30: Alternativer Reaktionsmechanismus für die Bildung von <i>meta</i> -DLP und OP-Lysin	42
Abb. 31: Reaktionsweg von GA und GX zur Bildung von HEL-1D und HEL-2D.....	44
Abb. 32: <i>N</i> ^α -Boc-Lysin Inkubationen mit Ribose bei 37 °C und pH 7,4 unter oxidativen (geschlossene Symbole) und nicht-oxidativen (offene Symbole) Bedingungen. (A) Bildung von HEL-1D relativ zur Gesamtkonzentration von HEL; (B) absoluter Gehalt von HEL (Gesamtkonzentration HEL, Summe aus HEL-1D und HEL-2D).	45
Abb. 33: Bildung von NDPO ₂	46
Abb. 34: Detektion des authentischen Referenzstandards (NDPO ₂) mittels LC-MS/MS über Retentionszeit und kollisionsinduzierter Dissoziation (CID).....	48
Abb. 35: Detektion von NDPO ₂ in UV-bestrahlten Lösungen mit NDP und <i>meta</i> -DLP (A) und OP-Lysin (B).....	48
Abb. 36: Schematische Darstellung der Aufarbeitung von kommerziellen Kartoffelchips...	50
Abb. 37: CID-Spektrum von <i>meta</i> -DLP (A) authentischer Referenzstandard und (B) Kartoffelchips-Proteinhydrolysat	53
Abb. 38: CID-Spektrum von OP-Lysin (A) authentischer Referenzstandard und (B) Kartoffelchips-Proteinhydrolysat	54
Abb. 39: Gehalte säurestabiler AGEs in kommerziellen Kartoffelchips	55
Abb. 40: Gleichgewicht zwischen MG-H3, CEA und MG-H1	58
Abb. 41: Bildung von HEL und DPL.....	60
Abb. 42: Darstellung von DPL.....	60
Abb. 43: Bildung von AGEs während des Frittierens von Kartoffelscheiben. (A) Δ Furosin, ● CEL, ○ CML und (B) ■ OP-Lysin, □ GLAP und ★ <i>meta</i> -DLP	61

Abb. 44: Bildung von Vorläuferstrukturen während des Frittierens von Kartoffelscheiben. (A) ○ absoluter Gehalt von HEL (Gesamtkonzentration HEL, Summe aus HEL-1D und HEL-2D), ▲ DPL und (B) ● HEL-1D relativ zur Gesamtkonzentration von HEL	63
Abb. 45: Derivatisierung von Ribose mit 1-Naphthylamin	64
Abb. 46: Zeitabhängige Bildung von AGEs während des Grillens von Rindfleischbratlingen	65

10 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der Präkursoren ausgewählter Pyridinium-Proteinmodifikationen.....	13
Tab. 2: Konzentrationen von Proteinmodifikationen in ausgewählten Lebensmittel-Matrices.....	17
Tab. 3: Intermediate und Produkte der Maillard-Reaktion in frittierten Kartoffelprodukten	22
Tab. 4: NMR- und HR-MS-Daten von <i>para</i> -DLP und <i>meta</i> -DLP in D ₂ O	31
Tab. 5: MS/MS-Übergänge der synthetisierten Standards.....	37
Tab. 6: NWG und BG von AGEs in Modellinkubationen	38
Tab. 7: Bildung von CML, HOP-Lysin, GLAP, <i>meta</i> -DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit <i>N</i> ^α - <i>tert</i> -Boc-Lysin und kurzkettigen Carbonylen nach sieben Tagen (pH 7,4) unter aeroben und anaeroben Bedingungen.....	39
Tab. 8: Bildung von CML, <i>meta</i> -DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit <i>N</i> ^α - <i>tert</i> -Boc-Lysin und verschiedenen Verhältnissen GA/GX nach sieben Tagen (pH 7,4) unter anaeroben Bedingungen.....	40
Tab. 9: Bildung von CML, HOP-Lysin, GLAP, <i>meta</i> -DLP, und OP-Lysin in Modellinkubationen mit <i>N</i> ^α - <i>tert</i> -Boc-Lysin und verschiedenen Zuckern nach sieben Tagen (pH 7,4) unter aeroben und anaeroben Bedingungen.....	43
Tab. 10: ¹ H-NMR Daten von NDP und NDPO ₂ in CD ₃ OD	47
Tab. 11: Übersicht der ermittelten Proteinausbeuten.....	51
Tab. 12: Gehalte von CML in ausgewählten Proteinisolaten und entfetteten Kartoffelchips.....	52
Tab. 13: NWG und BG von AGEs in Kartoffelchipsmatrix.....	52
Tab. 14: Gehalte ausgewählter säurelabiler AGEs in kommerziellen Kartoffelchips	57
Tab. 15: Gehalte ausgewählter Proteinmodifikationen in verschiedenen Bratlingen	66
Tab. 16: verwendete Chemikalien.....	84
Tab. 17: Geräteparameter LC-MS/MS.....	85
Tab. 18: Geräteparameter HLPC-FLD.....	85
Tab. 19: Geräteparameter präparative HPLC.....	85
Tab. 20: Geräteparameter sonstiger Geräte.....	86

11 Abkürzungsverzeichnis

1- ¹³ C-GA	1- ¹³ C-Glycolaldehyd
1-A-1,4-DDG	1-Amino-1,4-didesoxyglucoson
1-DG	1-Desoxyglucoson
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
3-AP	3-Aminopyridin
3-DG	3-Desoxyglucoson
4-AP	4-Aminopyridin
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
APT	Attached Proton Test
Asc	Ascorbinsäure
CEL	<i>N</i> ⁶ -Carboxyethyllysin
CID	collision induced dissoziation
CIS	cold-induced sweetening
CMA	<i>N</i> ⁷ -Carboxymethylarginin
CML	<i>N</i> ⁶ -Carboxymethyllysin
COSY	homonuclear correlation spectroscopy
DHA	Dehydroascorbinsäure
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FLD	Fluoreszenzdetektor
Furosin	<i>N</i> ⁶ -(2-Furoylmethyl)-L-Lysin
G3	Glyceraldehyd
GA	Glycolaldehyd
G-DH	Dihydroxyimidazolin
G-H	Hydroimidazolinon
GLAP	Glyceraldehyd-Pyridiniumlysin
GOLA	Glyoxal-Lysinamid
GOLD	Glyoxal-Lysin-Dimer
GX	Glyoxal
HEL-1D	<i>N</i> ⁶ -(2-Hydroxy-1d-ethyl)-Lysin
HEL-2D	<i>N</i> ⁶ -(2-Hydroxy-1,2-d-ethyl)-Lysin

HFBA	Heptafluorbuttersäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMF	5-Hydroxymethylfurfural
HOP-Lysin	Hydroxymethyl-oxido-Pyridiniumlysin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HR-MS	Hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
ISC	Intersystem Crossing
K2P	Lysin-Lysin-Pyridinium-Dimer
LAK-2	Lactaldehyd-Pyridiniumlysin-Dimer
LAPL	Lactaldehyd-Pyridinium-Dimer
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie Massenspektrometrie-Kopplung
MOLA	Methylglyoxal-Lysinamid
MOLD	Methylglyoxal-Lysin-Dimer
NaBD ₄	Natriumbordeuterid
NDP	Naphthalindipropionsäure
NDPO ₂	Naphthalindipropionsäure-Endoperoxid
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
OP-Lysin	3-Oxidopyridiniumlysin
PPh ₃	Triphenylphosphan
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOGS	Sensor-Green
TD-DFT	time dependent density functional theory
THF	Tetrahydrofuran

12 References

- (1) Maillard, L. C. Action of Amino Acids on Sugars. Formation of Melanoidins in a Methodical Way. *C. R. Acad. Sci.* **1912**, 66–68.
- (2) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10017–10026.
- (3) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, ageing, diabetes: a short history of the Maillard reaction. *Angew. Chem.* **2014**, *53*, 10316–10329.
- (4) Argirov, O. K.; Lin, B.; Ortwerth, B. J. 2-ammonio-6-(3-oxidopyridinium-1-yl)hexanoate (OP-lysine) is a newly identified advanced glycation end product in cataractous and aged human lenses. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6487–6495.
- (5) Cheng, R.; Feng, Q.; Argirov, O. K.; Ortwerth, B. J. Structure elucidation of a novel yellow chromophore from human lens protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 45441–45449.
- (6) Hofmann, T. Taste-active maillard reaction products: the "tasty" world of nonvolatile maillard reaction products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 20–29.
- (7) Cerny, C. The aroma side of the Maillard reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 66–71.
- (8) Benzing-Purdie, L. M.; Ripmeester, J. A.; Ratcliffe, C. I. Effects of temperature on Maillard reaction products. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, *33*, 31–33.
- (9) Warmbier, H. C.; Schnickels, R. A.; Labuza, T. P. Effect of Glycerol on Nonenzymatic Browning in a Solid Intermediate Moisture Model Food System. *J. Food Sci.* **1976**, *41*, 528–531.
- (10) Martins, S. I.; van Boekel, M. A. Kinetics of the glucose/glycine Maillard reaction pathways: influences of pH and reactant initial concentrations. *Food Chem.* **2005**, *92*, 437–448.
- (11) Huyghues-Despointes, A.; Yaylayan, V. A. Retro-Aldol and Redox Reactions of Amadori Compounds: Mechanistic Studies with Variouslly Labeled d -[¹³ C]Glucose. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 672–681.
- (12) Smith, P. C.; Chyoan, W. Nonenzymic glycation of albumin by acyl glucuronides in vitro comparison of reactions with reducing sugars. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *44*, 1661–1668.

- (13) Hodge, J. E. Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1953**, *1*, 928–943.
- (14) Heyns, K.; Paulsen, H.; Eichstedt, R.; Rolle, M. Über die Gewinnung von 2-Amino-Aldosen Durch Umlagerung von Ketosylaminen. *Chem. Ber.* **1957**, *90*, 2039–2049.
- (15) Ledl, F.; Schleicher, E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. *Angew. Chem.* **1990**, *29*, 565–594.
- (16) Reihl, O.; Rothenbacher, T. M.; Lederer, M. O.; Schwack, W. Carbohydrate carbonyl mobility--the key process in the formation of alpha-dicarbonyl intermediates. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1609–1618.
- (17) Biemel, K. M.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Unexpected Carbonyl Mobility in Aminoketoses: The Key to Major Maillard Crosslinks. *Angew. Chem.* **2002**, *41*, 801.
- (18) Kawakishi, S.; Tsunehiro, J.; Uchida, K. Autoxidative degradation of Amadori compounds in the presence of copper ion. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*, 167–171.
- (19) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of glucose: reinvestigation of reactive alpha-Dicarbonyl compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 8591–8597.
- (20) Tressl, R.; Rewicki, D. Heat Generated Flavors and Precursors. *Flavor Chem.*, 305–325.
- (21) Weenen, H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62*, 393–401.
- (22) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation pathways during Maillard-induced carbohydrate degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10198–10208.
- (23) Davídek, T.; Devaud, S.; Robert, F.; Blank, I. Sugar fragmentation in the maillard reaction cascade: isotope labeling studies on the formation of acetic acid by a hydrolytic beta-dicarbonyl cleavage mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6667–6676.
- (24) Hayami, J. Studies on the Chemical Decomposition of Simple Sugars. XII. Mechanism of the Acetol Formation. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1961**, *34*, 927–932.
- (25) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose in the presence of lysine leads to formation of carboxylic acid amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6458–6464.
- (26) Davídek, T.; Robert, F.; Devaud, S.; Vera, F. A.; Blank, I. Sugar fragmentation in the maillard reaction cascade: formation of short-chain carboxylic acids by a new oxidative alpha-dicarbonyl cleavage pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6677–6684.

- (27) Thornalley, P. J.; Langborg, A.; Minhas, H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* **1999**, *344*, 109–116.
- (28) Hofmann, T.; Bors, W.; Stettmaier, K. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 379–390.
- (29) Hayashi, T.; Ohta, Y.; Namiki, M. Electron spin resonance spectral study on the structure of the novel free radical products formed by the reactions of sugars with amino acids or amines. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 1282–1287.
- (30) Wells-Knecht, K. J.; Zyzak, D. V.; Litchfield, J. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochem.* **1995**, *34*, 3702–3709.
- (31) Zamora, R.; Navarro, J. L.; Aguilar, I.; Hidalgo, F. J. Lipid-derived aldehyde degradation under thermal conditions. *Food Chem.* **2015**, *174*, 89–96.
- (32) Lillard, D. A.; Day, E. A. Degradation of monocarbonyls from autoxidizing lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1964**, *41*, 549–552.
- (33) Voigt, M.; Smuda, M.; Pfahler, C.; Glomb, M. A. Oxygen-dependent fragmentation reactions during the degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5685–5691.
- (34) Anderson, M. M.; Hazen, S. L.; Hsu, F. F.; Heinecke, J. W. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive alpha-hydroxy and alpha,beta-unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J. Clin. Investig.* **1997**, *99*, 424–432.
- (35) Klaus, A.; Baldensperger, T.; Fiedler, R.; Girndt, M.; Glomb, M. A. Influence of Transketolase-Catalyzed Reactions on the Formation of Glycolaldehyde and Glyoxal Specific Posttranslational Modifications under Physiological Conditions. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1498–1508.
- (36) Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification-A role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Vascul. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565–573.
- (37) Vander Jagt, D. L.; Hunsaker, L. A. Methylglyoxal metabolism and diabetic complications: roles of aldose reductase, glyoxalase-I, betaine aldehyde

- dehydrogenase and 2-oxoaldehyde dehydrogenase. *Chem.-Biol. Interact.* **2003**, *143-144*, 341–351.
- (38) Kalapos, M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2013**, *99*, 260–271.
- (39) Voigt, M.; Glomb, M. A. Reactivity of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose: a key intermediate in the maillard chemistry of hexoses. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4765–4770.
- (40) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angew. Chem.* **2013**, *52*, 4887–4891.
- (41) Choei, H.; Sasaki, N.; Takeuchi, M.; Yoshida, T.; Ukai, W.; Yamagishi, S.-I.; Kikuchi, S.; Saito, T. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2004**, *108*, 189–193.
- (42) Shin, D. B.; Feather, M. S. The Degradation of L-Ascorbic Acid in Neutral Solutions Containing Oxygen. *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 461–469.
- (43) Simpson, G. L.; Ortwerth, B. J. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1501*, 12–24.
- (44) Oregioni, A.; Stieglitz, B.; Kelly, G.; Rittinger, K.; Frenkiel, T. Determination of the pKa of the N-terminal amino group of ubiquitin by NMR. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43748.
- (45) Fitch, C. A.; Platzer, G.; Okon, M.; Garcia-Moreno, B. E.; McIntosh, L. P. Arginine: Its pKa value revisited. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 752–761.
- (46) Isom, D. G.; Castañeda, C. A.; Cannon, B. R.; García-Moreno, B. Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 5260–5265.
- (47) Harms, M. J.; Schlessman, J. L.; Sue, G. R.; García-Moreno, B. Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 18954–18959.
- (48) Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19338–19345.
- (49) Jost, T.; Henning, C.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 3720–3731.

- (50) Cotham, W. E.; Metz, T. O.; Ferguson, P. L.; Brock, J. W. C.; Hinton, D. J. S.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W.; Ames, J. M. Proteomic analysis of arginine adducts on glyoxal-modified ribonuclease. *Mol. Cell. Proteom.* **2004**, *3*, 1145–1153.
- (51) Lo, T. W.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N alpha-acetylarginine, N alpha-acetylcysteine, and N alpha-acetyllysine, and bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32299–32305.
- (52) Klaus, A.; Rau, R.; Glomb, M. A. Modification and Cross-Linking of Proteins by Glycolaldehyde and Glyoxal: A Model System. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 10835–10843.
- (53) Ahmed, M. U.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 4889–4894.
- (54) Dunn, J. A.; Ahmed, M. U.; Murtiashaw, M. H.; Richardson, J. M.; Walla, M. D.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochem* **1990**, *29*, 10964–10970.
- (55) Fu, M. X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The advanced glycation end product, Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycooxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9982–9986.
- (56) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Analysis and Chemistry of Novel Protein Oxidation Markers in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 4692–4701.
- (57) Henning, C.; Smuda, M.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Molecular basis of maillard amide-advanced glycation end product (AGE) formation in vivo. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 44350–44356.
- (58) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638–41647.
- (59) Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3957–3965.

- (60) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N6-Carboxymethyl Lysine and N6-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1898–1906.
- (61) Finot, P. A.; Bricout, J.; Viani, R.; Mauron, J. Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia* **1968**, *24*, 1097–1099.
- (62) Henle, T.; Zehetner, G.; Klostermeyer, H. Fast and sensitive determination of furosine. *Z. Lebensm. Unters. Forch.* **1995**, *200*, 235–237.
- (63) Yu, H.; Zhong, Q.; Xie, Y.; Guo, Y.; Cheng, Y.; Yao, W. Kinetic study on the generation of furosine and pyrraline in a Maillard reaction model system of d-glucose and l-lysine. *Food Chem.* **2020**, *317*, 126458.
- (64) Ferrer, E.; Alegría, A.; Courtois, G.; Farré, R. High-performance liquid chromatographic determination of Maillard compounds in store-brand and name-brand ultra-high-temperature-treated cows' milk. *J. Chromatogr. A* **2000**, *881*, 599–606.
- (65) Glomb, M. A.; Lang, G. Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1493–1501.
- (66) Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Cross-linking of proteins by maillard processes—characterization and detection of a lysine-arginine cross-link derived from d-glucose. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1081–1088.
- (67) Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M. Glucosepane is a major protein cross-link of the senescent human extracellular matrix. Relationship with diabetes. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 12310–12315.
- (68) Chellan, P.; Nagaraj, R. H. Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *368*, 98–104.
- (69) Odani, H.; Shinzato, T.; Usami, J.; Matsumoto, Y.; Brinkmann F. E.; Baynes, J. W.; Maeda, K. Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 381–385.
- (70) Nagaraj, R. H.; Linetsky, M.; Stitt, A. W. The pathogenic role of Maillard reaction in the aging eye. *J. Amino Acids* **2012**, *42*, 1205–1220.
- (71) Shigeta, T.; Sasamoto, K.; Yamamoto, T. Glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products having pyrrolopyridinium-based crosslinks. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *26*, 100963.

- (72) Sell, D. R.; Monnier, V. M. Structure Elucidation of a Senescence Cross-Link from Human Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 21597–21602.
- (73) Biemel, K. M.; Reihl, O.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Formation pathways for lysine-arginine cross-links derived from hexoses and pentoses by Maillard processes: unraveling the structure of a pentosidine precursor. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23405–23412.
- (74) Nagaraj, R. H.; Monnier, V. M. Isolation and characterization of a blue fluorophore from human eye lens crystallins: In vitro formation from Maillard reaction with ascorbate and ribose. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1992**, *1116*, 34–42.
- (75) Nakamura, K.; Nakazawa, Y.; Ienaga, K. Acid-stable fluorescent advanced glycation end products: vesperlysines A, B, and C are formed as crosslinked products in the Maillard reaction between lysine or proteins with glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *232*, 227–230.
- (76) Tessier, F.; Obrenovich, M.; Monnier, V. M. Structure and mechanism of formation of human lens fluorophore LM-1. Relationship to vesperlysine A and the advanced Maillard reaction in aging, diabetes, and cataractogenesis. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20796–20804.
- (77) Cheng, R.; Feng, Q.; Ortwerth, B. J. LC-MS display of the total modified amino acids in cataract lens proteins and in lens proteins glycated by ascorbic acid in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1762*, 533–543.
- (78) Usui, T.; Hayase, F. Isolation and identification of the 3-hydroxy-5-hydroxymethylpyridinium compound as a novel advanced glycation end product on glyceraldehyde-related Maillard reaction. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, *67*, 930–932.
- (79) Usui, T.; Shimohira, K.; Watanabe, H.; Hayase, F. Detection and determination of glyceraldehyde-derived pyridinium-type advanced glycation end product in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, *71*, 442–448.
- (80) Takeuchi, M.; Yamagishi, S. Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) in vivo. *Med. Hypotheses* **2004**, *63*, 453–455.
- (81) Tessier, F. J.; Monnier, V. M.; Sayre, L. M.; Kornfield, J. A. Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* **2003**, *369*, 705–719.
- (82) Nagai, R.; Hayashi, C. M.; Xia, L.; Takeya, M.; Horiuchi, S. Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48905–48912.

- (83) Argirov, O. K.; Lin, B.; Olesen, P.; Ortwerth, B. J. Isolation and characterization of a new advanced glycation endproduct of dehydroascorbic acid and lysine. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2003**, *1620*, 235–244.
- (84) Fujimoto, S.; Murakami, Y.; Miyake, H.; Hayase, F.; Watanabe, H. Identification of a novel advanced glycation end product derived from lactaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83*, 1136–1145.
- (85) Shigeta, T.; Sasamoto, K.; Yamamoto, T. A novel crosslinked type of advanced glycation end-product derived from lactaldehyde. *Heliyon* **2020**, *6*, e05337.
- (86) Taylor, A.; Jacques, P. F.; Nowell, T.; Perrone, G.; Blumberg, J.; Handelman, G.; Jozwiak, B.; Nadler, D. Vitamin C in human and guinea pig aqueous, lens and plasma in relation to intake. *Curr. Eye Res.* **1997**, *16*, 857–864.
- (87) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard degradation pathways of vitamin C. *Angew. Chem.* **2013**, *52*, 4887–4891.
- (88) Wondrak, G. T.; Jacobson, M. K.; Jacobson, E. L. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2006**, *5*, 215–237.
- (89) Bonnett, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19.
- (90) DeRosa, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233-234*, 351–371.
- (91) Wu, H.; Song, Q.; Ran, G.; Lu, X.; Xu, B. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. *Trends Analyt. Chem.* **2011**, *30*, 133–141.
- (92) Olea, A. F.; Wilkinson, F. Singlet Oxygen Production from Excited Singlet and Triplet States of Anthracene Derivatives in Acetonitrile. *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 4518–4524.
- (93) Müller, K.; Ziereis, K. Dimethyl 3,3'-(4-Methyl-1,3-naphthylene)dipropionate as a Singlet Oxygen Trap in Biological Systems. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1993**, *326*, 369–371.
- (94) Müller, K.; Ziereis, K. Naphthalenes as Water-Soluble Singlet Oxygen Carriers and Detectors: Hydrophobic and Kinetic Properties. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **1992**, *325*, 219–223.
- (95) Aubry, J. M. Search for singlet oxygen in the decomposition of hydrogen peroxide by mineral compounds in aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5844–5849.

- (96) Pierlot, C.; Hajjam, S.; Barthélémy, C.; Aubry, J.-M. Water-soluble naphthalene derivatives as singlet oxygen (1O_2 , $1\Delta_g$) carriers for biological media. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *36*, 31–39.
- (97) Pierlot, C.; Poprawski, J.; Marko, J.; Aubry, J.-M. Effects of oxygenated substituents on the [4+2] cycloaddition of singlet oxygen in the photooxygenation of water-soluble naphthyl ethers. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5063–5067.
- (98) Flors, C.; Fryer, M. J.; Waring, J.; Reeder, B.; Bechtold, U.; Mullineaux, P. M.; Nonell, S.; Wilson, M. T.; Baker, N. R. Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 1725–1734.
- (99) Gollmer, A.; Arnbjerg, J.; Blaikie, F. H.; Pedersen, B. W.; Breitenbach, T.; Daasbjerg, K.; Glasius, M.; Ogilby, P. R. Singlet Oxygen Sensor Green®: photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. *Photochem. Photobiol.* **2011**, *87*, 671–679.
- (100) Ortwerth, B. J.; Prabhakaram, M.; Nagaraj, R. H.; Linetsky, M. The relative UV sensitizer activity of purified advanced glycation endproducts. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 666–672.
- (101) Linetsky, M.; Ortwerth, B. J. Quantitation of the singlet oxygen produced by UVA irradiation of human lens proteins. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 522–529.
- (102) Ortwerth, B. J.; Chemoganskiy, V.; Olesen, P. R. Studies on singlet oxygen formation and UVA light-mediated photobleaching of the yellow chromophores in human lenses. *Exp. Eye Res.* **2002**, *74*, 217–229.
- (103) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2008.
- (104) van Boekel, M. A. J. S. Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung* **2001**, *45*, 150–159.
- (105) Luz Sanz, M.; Corzo-Martínez, M.; Rastall, R. A.; Olano, A.; Moreno, F. J. Characterization and in vitro digestibility of bovine beta-lactoglobulin glycosylated with galactooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7916–7925.
- (106) Teodorowicz, M.; van Neerven, J.; Savelkoul, H. Food Processing: The Influence of the Maillard Reaction on Immunogenicity and Allergenicity of Food Proteins. *Nutrients* **2017**, *9*.

- (107) Hellwig, M.; Matthes, R.; Peto, A.; Löbner, J.; Henle, T. N- ϵ -fructosyllysine and N- ϵ -carboxymethyllysine, but not lysinoalanine, are available for absorption after simulated gastrointestinal digestion. *Amino acids* **2014**, *46*, 289–299.
- (108) Roncero-Ramos, I.; Delgado-Andrade, C.; Tessier, F. J.; Niquet-Léridon, C.; Strauch, C.; Monnier, V. M.; Navarro, M. P. Metabolic transit of N(ϵ)-carboxymethyl-lysine after consumption of AGEs from bread crust. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1032–1039.
- (109) Förster, A.; Kühne, Y.; Henle, T. Studies on absorption and elimination of dietary maillard reaction products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043*, 474–481.
- (110) Huebschmann, A. G.; Regensteiner, J. G.; Vlassara, H.; Reusch, J. E. B. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes care* **2006**, *29*, 1420–1432.
- (111) Chuah, Y. K.; Basir, R.; Talib, H.; Tie, T. H.; Nordin, N. Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases. *Int. J. Inflamm.* **2013**, *2013*, 403460.
- (112) Hellwig, M.; Bunzel, D.; Huch, M.; Franz, C. M. A. P.; Kulling, S. E.; Henle, T. Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6723–6730.
- (113) Hellwig, M.; Auerbach, C.; Müller, N.; Samuel, P.; Kammann, S.; Beer, F.; Gunzer, F.; Henle, T. Metabolization of the Advanced Glycation End Product N- ϵ -Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. coli Strains. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1963–1972.
- (114) Assar, S. H.; Moloney, C.; Lima, M.; Magee, R.; Ames, J. M. Determination of N- ϵ -(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino acids* **2009**, *36*, 317–326.
- (115) Niu, L.; Kong, S.; Chu, F.; Huang, Y.; Lai, K. Investigation of Advanced Glycation End-Products, α -Dicarbonyl Compounds, and Their Correlations with Chemical Composition and Salt Levels in Commercial Fish Products. *Foods* **2023**, *12*, 4324.
- (116) Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of N ϵ -carboxymethyllysine and N ϵ -carboxyethyllysine in ground beef during heating as affected by fat, nitrite and erythorbate. *J. Food Meas. Charact.* **2017**, *11*, 320–328.
- (117) Treibmann, S.; Hellwig, A.; Hellwig, M.; Henle, T. Lysine-Derived Protein-Bound Heyns Compounds in Bakery Products. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10562–10570.
- (118) Schwarzenbolz, U.; Hofmann, T.; Sparmann, N.; Henle, T. Free Maillard Reaction Products in Milk Reflect Nutritional Intake of Glycated Proteins and Can Be Used to

- Distinguish "Organic" and "Conventionally" Produced Milk. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 5071–5078.
- (119) Li, C.; Zhang, L.; Gao, W.; Lai, C.; Dong, H. Robust Detection of Advanced Glycation Endproducts in Milk Powder Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS). *Food Anal. Methods* **2021**, *14*, 1472–1481.
- (120) Lin, Y.; Huang, S.; Liao, K.; Ho, C.; Hung, W. Quantitation of α -Dicarbonyls, Lysine- and Arginine-Derived Advanced Glycation End Products, in Commercial Canned Meat and Seafood Products. *J. Agric. Food Chem.* **2023**, *71*, 6727–6737.
- (121) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Analysis of Glyoxal- and Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products during Grilling of Porcine Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 15374–15383.
- (122) Wagner, R.; Grosch, W. Evaluation of Potent Odorants of French Fries. *LWT - Food Sci. Technol.* **1997**, *30*, 164–169.
- (123) Schnermann, P.; Schieberle, P. Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 867–872.
- (124) Dunkel, A.; Steinhaus, M.; Kotthoff, M.; Nowak, B.; Krautwurst, D.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 7124–7143.
- (125) Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* **2007**, *24*, 115–119.
- (126) Lund, M. N.; Lametsch, R.; Hviid, M. S.; Jensen, O. N.; Skibsted, L. H. High-oxygen packaging atmosphere influences protein oxidation and tenderness of porcine longissimus dorsi during chill storage. *Meat sci.* **2007**, *77*, 295–303.
- (127) Ngadi, M. O.; Watts, K. C.; Correia, L. R. Finite element method modelling of moisture transfer in chicken drum during deep-fat frying. *J. Food Eng.* **1997**, *32*, 11–20.
- (128) Gertz, C. Fundamentals of the frying process. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2014**, *116*, 669–674.
- (129) Farkas, B. E.; Singh, R. P.; Rumsey, T. R. Modeling heat and mass transfer in immersion frying. I, model development. *J. Food Eng.* **1996**, *29*, 211–226.
- (130) Farkas, B. E.; Singh, R. P.; Rumsey, T. R. Modeling heat and mass transfer in immersion frying. II, model solution and verification. *J. Food Eng.* **1996**, *29*, 227–248.

- (131) Sablani, S.; Mujumdar, A. Drying of Potato, Sweet Potato, and Other Roots. *J. Cereal Sci.* **2004**, 151–465.
- (132) Arefi, A.; Hensel, O.; Sturm, B. Intelligent potato frying: Time to say goodbye to the “good old” processing strategies. *Therm. Sci. Eng. Prog.* **2022**, *34*, 101389.
- (133) Pęksa, A.; Miedzianka, J. Potato Industry By-Products as a Source of Protein with Beneficial Nutritional, Functional, Health-Promoting and Antimicrobial Properties. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 3497.
- (134) Pęksa, A.; Kita, A.; Kułakowska, K.; Aniołowska, M.; Hamouz, K.; Nemś, A. The quality of protein of coloured fleshed potatoes. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2960–2966.
- (135) Sowokinos, J. R. Biochemical and molecular control of cold-induced sweetening in potatoes. *Am. J. Pot. Res.* **2001**, *78*, 221–236.
- (136) Cottrell, J. E.; Duffus, C. M.; Paterson, L.; Mackay, G. R.; Allison, M. J.; Bain, H. The effect of storage temperature on reducing sugar concentration and the activities of three amylolytic enzymes in tubers of the cultivated potato, *Solanum tuberosum* L. *Potato Res.* **1993**, *36*, 107–117.
- (137) Knowles, N. R.; Driskill, E. P.; Knowles, L. O. Sweetening responses of potato tubers of different maturity to conventional and non-conventional storage temperature regimes. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *52*, 49–61.
- (138) Wang, Y.; Chen, L.; Yang, T.; Ma, Y.; McClements, D. J.; Ren, F.; Tian, Y.; Jin, Z. A review of structural transformations and properties changes in starch during thermal processing of foods. *Food Hydrocoll.* **2021**, *113*, 106543.
- (139) Wang, S.; Chao, C.; Cai, J.; Niu, B.; Copeland, L. Starch-lipid and starch-lipid-protein complexes: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1056–1079.
- (140) Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2005**, *15*, 316–328.
- (141) Nair, V.; Vietti, D. E.; Cooper, C. S. Degenerative chemistry of malondialdehyde. Structure, stereochemistry, and kinetics of formation of enaminals from reaction with amino acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 3030–3036.
- (142) Nair, V.; Cooper, C. S.; Vietti, D. E.; Turner, G. A. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* **1986**, *21*, 6–10.
- (143) Eggen, M. D.; Merboth, P.; Neukirchner, H.; Glomb, M. A. Lipid Peroxidation Has Major Impact on Malondialdehyde-Derived but Only Minor Influence on Glyoxal and

- Methylglyoxal-Derived Protein Modifications in Carbohydrate-Rich Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 10271–10283.
- (144) Ledbetter, M.; Blidi, S.; Ackon, S.; Bruno, F.; Sturrock, K.; Pellegrini, N.; Fiore, A. Effect of novel sequential soaking treatments on Maillard reaction products in potato and alternative vegetable crisps. *Heliyon* **2021**, *7*, e07441.
- (145) Çatak, J. Quantitative Analyses of Glyoxal and Methylglyoxal Compounds in French Fry Samples by HPLC Using 4-Nitro-1,2-Phenlenediamine as A Derivatizing Reagent. *JIRR* **2020**, 20–24.
- (146) Cheng, W.; Wang, X.; Zhang, Z.; Ma, L.; Liu, G.; Wang, Q.; Chen, F.; Cheng, K.-W. Development of an Isotope Dilution UHPLC-QqQ-MS/MS-Based Method for Simultaneous Determination of Typical Advanced Glycation End Products and Acrylamide in Baked and Fried Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 2611–2618.
- (147) Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of advanced glycation endproducts in selected food items by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry: Presentation of a dietary AGE database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145–1150.
- (148) Miao, Y.; Zhang, H.; Zhang, L.; Wu, S.; Sun, Y.; Shan, Y.; Yuan, Y. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in reconstituted potato chips during frying. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 4005–4011.
- (149) Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Browning indicators in bread. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 4176–4181.
- (150) Hellwig, M.; Henle, T. Quantification of the Maillard reaction product 6-(2-formyl-1-pyrrolyl)-1-norleucine (formylone) in food. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *235*, 99–106.
- (151) Hellwig, M.; Henle, T. Release of pyrroline in absorbable peptides during simulated digestion of casein glycated by 3-deoxyglucosone. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *237*, 47–55.
- (152) Hayase, F.; Nagaraj, R. H.; Miyata, S.; Njoroge, F. G.; Monnier, V. M. Aging of Proteins: Immunological Detection of a Glucose-derived Pyrrole Formed during Maillard Reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 3758–3764.
- (153) Hellwig, M.; Geissler, S.; Peto, A.; Knütter, I.; Brandsch, M.; Henle, T. Transport of free and peptide-bound pyrroline at intestinal and renal epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6474–6480.

- (154) Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4998–5006.
- (155) Yaylayan, V. A.; Wnorowski, A.; Perez Locas, C. Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 1753–1757.
- (156) Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.; Ehrenberg, L.; Törnqvist, M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7012–7018.
- (157) Gökmen, V.; Palazoğlu, T. K.; Şenyuva, H. Z. Relation between the acrylamide formation and time–temperature history of surface and core regions of French fries. *J. Food Eng.* **2006**, *77*, 972–976.
- (158) Elmore, J. S.; Briddon, A.; Dodson, A. T.; Muttucumaru, N.; Halford, N. G.; Mottram, D. S. Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time. *Food Chem.* **2015**, *182*, 1–8.
- (159) Zhang, Y.; Kahl, D. H. W.; Bizimungu, B.; Lu, Z.-X. Effects of blanching treatments on acrylamide, asparagine, reducing sugars and colour in potato chips. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 4028–4041.
- (160) Zhang, C.; Lyu, X.; Zhao, W.; Yan, W.; Wang, M.; Kuan Rei, N. G.; Yang, R. Effects of combined pulsed electric field and blanching pretreatment on the physiochemical properties of French fries. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2021**, *67*, 102561.
- (161) Fan, X.; Reneker, L. W.; Obrenovich, M. E.; Strauch, C.; Cheng, R.; Jarvis, S. M.; Ortwerth, B. J.; Monnier, V. M. Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 16912–16917.
- (162) Milkovska-Stamenova, S.; Hoffmann, R. Diversity of advanced glycation end products in the bovine milk proteome. *J. Amino Acids* **2019**, *51*, 891–901.
- (163) Adamczyk, M.; Johnson, D. D.; Reddy, R. E. Collagen cross-links: Synthesis of pyridinoline, deoxypyridinoline and their analogues. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 63–88.
- (164) Strazzolini, P.; Melloni, T.; Giumanini, A. G. Selective nitrolytic deprotection of N -BOC-amines and N -BOC-amino acids derivatives. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9033–9043.
- (165) Gellett, A. M.; Huber, P. W.; Higgins, P. J. Synthesis of the unnatural amino acid N-N-(ferrocene-1-acetyl)-l-lysine: a novel organometallic nuclease. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 2959–2962.

- (166) Mullica, D. F.; Tippin, D. B.; Sappenfield, E. L. The crystal structure analysis of iron nitroprusside, $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 3\text{H}_2\text{O}$. *J. crystallogr. spectrosc. res.* **1991**, *21*, 81–85.
- (167) Zhao, T.; Sun, G. Synthesis and characterization of antimicrobial cationic surfactants: Aminopyridinium salts. *J. Surfact. Deterg.* **2006**, *9*, 325–330.
- (168) Ito, T.; Ikemoto, T.; Isogami, Y.; Wada, H.; Sera, M.; Mizuno, Y.; Wakimasu, M. Practical Synthesis of Low-Density Lipoprotein Receptor Upregulator, N-[1-(3-Phenylpropane-1-yl)piperidin-4-yl]-5-thia-1,8-diazaacenaphthylene-4-carboxamide. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 238–241.
- (169) Fossey, J.; Loupy, A.; Strzelecka, H. An ab initio study of protonation and alkylation of aminopyridine. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1935–1941.
- (170) Kalatzis, E.; Kiriazis, L. Reactions of N-heteroaromatic bases with nitrous acid. Part 9. Kinetics of the nitrosation of 1-methyl-3- and 1-methyl-4-methylaminopyridinium perchlorate in aqueous perchloric acid and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectra of 1-methyl-4-alkylamino-substituted pyridinium ions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1989**, 179.
- (171) Mainka, D. L.; Schwarz, J.; Girreser, U. Temperature dependent analysis of Octenidine (N,N'-(decane-1,10-diyl)dipyridin-1-yl-4-ylidene)dioctan-1-amine) dihydrochloride by NMR and NIR spectroscopy. *Arkivoc* **2020**, *2020*, 287–298.
- (172) Weisstuch, A.; Testa, A. C. Fluorescence study of aminopyridines. *J. Phys. Chem.* **1968**, *72*, 1982–1987.
- (173) Broquier, M.; Soorkia, S.; Dedonder-Lardeux, C.; Jouvét, C.; Theulé, P.; Grégoire, G. Twisted Intramolecular Charge Transfer in Protonated Amino Pyridine. *J. Phys. Chem. A* **2016**, *120*, 3797–3809.
- (174) Herbich, J.; Waluk, J. Excited charge transfer states in 4-aminopyrimidines, 4-(dimethylanilino)pyrimidine and 4-(dimethylamino)pyridine. *Chem. Phys.* **1994**, *188*, 247–265.
- (175) Gawinecki, R.; Stanovnik, B.; Valkonen, A.; Kolehmainen, E.; Ośmiałowski, B.; Dobosz, R.; Zakrzewska, A. Effect of vinylene and 1,4-phenylene spacers on efficiency of the ground-state intramolecular charge-transfer in enlarged 4-dimethylamino-1-methylpyridinium cations. *Struct. Chem.* **2009**, *20*, 655–662.
- (176) Fan, X.; Monnier, V. M. Inhibition of crystallin ascorbylation by nucleophilic compounds in the hSVCT2 mouse model of lenticular aging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 4945–4952.

- (177) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive analysis of maillard protein modifications in human lenses: effect of age and cataract. *Biochem.* **2015**, *54*, 2500–2507.
- (178) Ortwerth, B. J.; Olesen, P. R. Ascorbic acid-induced crosslinking of lens proteins: evidence supporting a Maillard reaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *956*, 10–22.
- (179) Davies, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *305*, 761–770.
- (180) Aubry, J. M.; Cazin, B. Chemical sources of singlet oxygen. 2. Quantitative generation of singlet oxygen from hydrogen peroxide disproportionation catalyzed by molybdate ions. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 2013–2014.
- (181) Niyati-Shirkhodae, F.; Shibamoto, T. Gas chromatographic analysis of glyoxal and methylglyoxal formed from lipids and related compounds upon ultraviolet irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 227–230.
- (182) Onyango, A. N. Small reactive carbonyl compounds as tissue lipid oxidation products; and the mechanisms of their formation thereby. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 777–786.
- (183) Waglay, A.; Karboune, S.; Khodadadi, M. Investigation and optimization of a novel enzymatic approach for the isolation of proteins from potato pulp. *LWT - Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 197–205.
- (184) van Damme, E. J. M.; Barre, A.; Rougé, P.; Peumans, W. J. Potato lectin: an updated model of a unique chimeric plant protein. *Plant Mol. Biol.* **2004**, *37*, 34–45.
- (185) Quan, W.; Wu, Z.; Jiao, Y.; Liu, G.; Wang, Z.; He, Z.; Tao, G.; Qin, F.; Zeng, M.; Chen, J. Exploring the relationship between potato components and Maillard reaction derivative harmful products using multivariate statistical analysis. *Food Chem.* **2021**, *339*, 127853.
- (186) Dong, L.; Qiu, C.; Wang, R.; Zhang, Y.; Wang, J.; Liu, J.; Yu, H.; Wang, S. Effects of Air Frying on French Fries: The Indication Role of Physicochemical Properties on the Formation of Maillard Hazards, and the Changes of Starch Digestibility. *Front. nutr.* **2022**, *9*, 889901.
- (187) Maasen, K.; Scheijen, J. L. J. M.; Opperhuizen, A.; Stehouwer, C. D. A.; van Greevenbroek, M. M.; Schalkwijk, C. G. Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls. *Food Chem.* **2021**, *339*, 128063.

- (188) Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. *Handbook of food enzymology*, 1st ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2003.
- (189) Li, X.; Zhang, T.; Donnelly, D. Selective loss of cysteine residues and disulphide bonds in a potato proteinase inhibitor II family. *PloS one* **2011**, *6*, e18615.
- (190) Njoroge, F. G.; Sayre, L. M.; Monnier, V. M. Detection of D-glucose-derived pyrrole compounds during Maillard reaction under physiological conditions. *Carbohydr. Res.* **1987**, *167*, 211–220.
- (191) Albaugh, B. N.; Arnold, K. M.; Denu, J. M. KAT(ching) metabolism by the tail: insight into the links between lysine acetyltransferases and metabolism. *Chembiochem* **2011**, *12*, 290–298.
- (192) Wagner, G. R.; Payne, R. M. Widespread and enzyme-independent N ϵ -acetylation and N ϵ -succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 29036–29045.
- (193) Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 7071–7079.
- (194) Huang, Y.; Lu, J.; Li, M.; Li, C.; Wang, Y.; Shen, M.; Chen, Y.; Nie, S.; Zeng, M.; Chen, J.; *et al.* Effect of acidity regulators on acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural formation in French fries: The dual role of pH and acid radical ion. *Food Chem.* **2022**, *371*, 131154.
- (195) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of arginine modifications in a model system of N α -tert-butoxycarbonyl (Boc)-arginine with methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 394–401.
- (196) Hein, W. G.; Simat, T. J.; Steinhart, H. Detection of irradiated food. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *210*, 299–304.
- (197) Chuaqui-Offermans, N.; McDougall, T. An HPLC method to determine o-tyrosine in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39*, 300–302.
- (198) Hart, R. J.; White, J. A.; Reid, W. J. Technical note: Occurrence of o-tyrosine in non-irradiated foods. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1988**, *23*, 643–647.
- (199) Voigt, M.; Smuda, M.; Pfahler, C.; Glomb, M. A. Oxygen-dependent fragmentation reactions during the degradation of 1-deoxy-D-erythro-hexo-2,3-diulose. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5685–5691.
- (200) Martin-Morales, A.; Arakawa, T.; Sato, M.; Matsumura, Y.; Mano-Usui, F.; Ikeda, K.; Inagaki, N.; Sato, K. Development of a Method for Quantitation of Glyceraldehyde in

- Various Body Compartments of Rodents and Humans. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 13246–13254.
- (201) Acharya, A. S.; Sussman, L. G.; Jones, W. M.; Manning, J. M. Inhibition of deoxyhemoglobin S polymerization by glyceraldehyde. *Anal. Biochem.* **1984**, *136*, 101–109.
- (202) Acharya, A. S.; Sussman, L. G.; Manjula, B. N. Application of reductive dihydroxypropylation of amino groups of proteins in primary structural studies: identification of phenylthiohydantoin derivative of epsilon-dihydroxypropyl-lysine residues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **1984**, *297*, 37–48.
- (203) Moyano, P. C.; Berna, A. Z. Modelling Water Loss During Frying of Potato Strips: Effect of Solute Impregnation. *Dry. Technol.* **2002**, *20*, 1303–1318.
- (204) Yuan, Y.; Huanjie, Z.; Jie, D.; Yutian, M.; Fang, C.; Xiaosong, H. A predictive model of acrylamide formation influenced by moisture content, lipid oxidation, and methylglyoxal in fried potato slices. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6608.
- (205) Koutsidis, G.; Elmore, J. S.; Oruna-Concha, M. J.; Campo, M. M.; Wood, J. D.; Mottram, D. S. Water-soluble precursors of beef flavour. Part II: Effect of post-mortem conditioning. *Meat sci.* **2008**, *79*, 270–277.
- (206) Meinert, L.; Schäfer, A.; Bjerregaard, C.; Aaslyng, M. D.; Bredie, W. L. P. Comparison of glucose, glucose 6-phosphate, ribose, and mannose as flavour precursors in pork; the effect of monosaccharide addition on flavour generation. *Meat sci.* **2009**, *81*, 419–425.
- (207) Farmer, L. J.; Mottram, D. S.; Whitfield, F. B. Volatile compounds produced in maillard reactions involving cysteine, ribose and phospholipid. *J. Sci. Food Agric.* **1989**, *49*, 347–368.
- (208) Mottram, D. S.; Whitfield, F. B. Volatile Compounds from the Reaction of Cysteine, Ribose, and Phospholipid in Low-Moisture Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 984–988.
- (209) Chen, G.; Smith, J. S. Determination of advanced glycation endproducts in cooked meat products. *Food Chem.* **2015**, *168*, 190–195.
- (210) Rakete, S.; Glomb, M. A. A novel approach for the quantitation of carbohydrates in mash, wort, and beer with RP-HPLC using 1-naphthylamine for precolumn derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3828–3833.

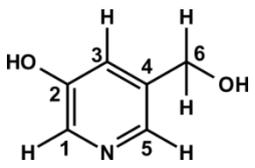
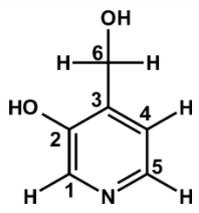
- (211) Treibmann, S.; Spengler, F.; Degen, J.; Löbner, J.; Henle, T. Studies on the Formation of 3-Deoxyglucosone- and Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolones of Creatine during Heat Treatment of Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5874–5881.
- (212) Yu, L.; Gao, C.; Zeng, M.; He, Z.; Wang, L.; Zhang, S.; Chen, J. Effects of raw meat and process procedure on N ϵ -carboxymethyllysine and N ϵ -carboxyethyl-lysine formation in meat products. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1163–1168.
- (213) Davidek, T.; Gouézec, E.; Devaud, S.; Blank, I. Origin and yields of acetic acid in pentose-based Maillard reaction systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 241–243.

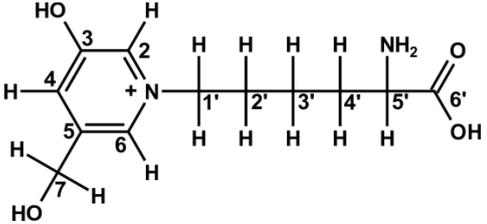
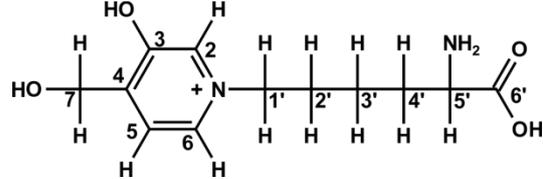
13 Anhang

13.1 Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen

13.1.1 ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten in CDCl_3

<i>N</i> ^o -Boc-Lysin- <i>tert</i> -butylester			<i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc)-Amino]-6-hydroxyhexansäure			<i>tert</i> -Boc-2-[(<i>tert</i> -Boc)-Amino]-6-iodhexansäure		
H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1	-	171,9	1	-	171,8	1	-	171,7
2	4,20 (t, 1H) $^3\text{J} = 7,4$ Hz	53,8	2	4,19 (t, 1H) $^3\text{J} = 7,4$ Hz	53,8	2	4,18 (t, 1H) $^3\text{J} = 7,4$ Hz	53,6
3	1,68 (m, 2H)	32,0	3	1,68 (m, 2H)	32,2	3	1,63 (m, 2H)	32,1
4	1,79 (m, 2H)	26,1	4	1,79 (m, 2H)	26,1	4	1,76 (m, 2H)	26,0
5	1,81 (m, 2H)	31,9	5	1,83 (m, 2H)	32,1	5	1,81 (m, 2H)	31,9
6	2,50 (t, 2H) $^3\text{J} = 7,2$ Hz	22,6	6	3,33 (t, 2H) $^3\text{J} = 7,2$ Hz	62,3	6	3,20 (t, 2H) $^3\text{J} = 7,2$ Hz	6,4
7	5,07 (d, 1H) $^3\text{J} = 7,5$ Hz	-	7	5,07 (d, 1H) $^3\text{J} = 7,5$ Hz	-	7	5,05 (d, 1H) $^3\text{J} = 7,5$ Hz	-
8	-	155,3	8	-	155,3	8	-	155,3
9	-	81,9	9	-	81,9	9	-	81,9
9'	-	79,3	9'	-	79,3	9'	-	79,3
10	1,48 (s, 9H)	28,3	10	1,48 (s, 9H)	28,3	10	1,47 (s, 9H)	28,3
10'	1,45 (s, 9H)	28,0	10'	1,45 (s, 9H)	28,0	10'	1,44 (s, 9H)	28,0

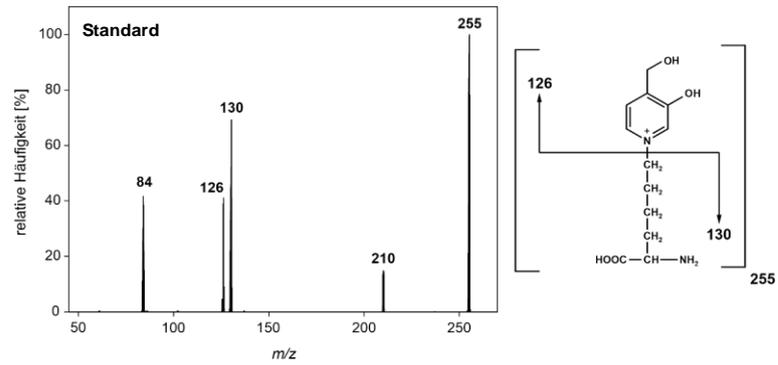
3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridin			3-Hydroxy-5-hydroxymethylpyridin		
					
H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1	7,99 (m, 2H)	141,0	1	8,34 (s, 1H)	132,1
2	-	153,8	2	-	154,7
3	7,26 (m, 1H)	115,5	3	-	140,7
4	-	137,8	4	7,93 (d, 1H) $^3\text{J} = 6,2$ Hz	127,7
5	7,99 (m, 2H)	141,3	5	8,27 (d, 1H) $^3\text{J} = 6,2$ Hz	125,5
6	4,83 (s, 1H)	60,1	6	4,49 (s, 1H)	60,0

GLAP			HOP-Lysin		
					
HR-MS [M] ⁺		255,1340	HR-MS [M] ⁺		255,1340
berechnet C ₁₂ H ₁₉ O ₄ N ₂		255,1345	berechnet C ₁₂ H ₁₉ O ₄ N ₂		255,1345
H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]	H/C	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
2	8,77 (s, 1H)	138,1	2	8,41 (s, 1H)	137,3
3	-	155,9	3	-	154,9
4	8,08 (s, 1H)	125,5	4	-	149,0
5	-	141,4	5	7,96 (d, 1H) $^3\text{J} = 6,2$ Hz	124,6
6	8,55 (s, 1H)	134,2	6	8,26 (d, 1H) $^3\text{J} = 6,2$ Hz	130,0
7	4,78 (s, 2H)	63,1	7	4,89 (s, 2H)	59,9
1'	4,19 (t, 2H) $^3\text{J} = 6,9$ Hz	60,7	1'	4,53 (t, 2H) $^3\text{J} = 7,0$ Hz	61,1
2'	1,96 (m, 2H)	30,1	2'	1,87 (m, 2H)	31,3
3'	1,40 (m, 2H)	21,5	3'	1,75 (m, 2H)	23,6
4'	1,58 (m, 2H)	29,8	4'	1,75 (m, 2H)	24,7
5'	3,91 (t, 1H) $^3\text{J} = 6,1$ Hz	54,5	5'	3,94 (t, 1H) $^3\text{J} = 6,0$ Hz	53,2
6'	-	173,1	6'	-	171,6

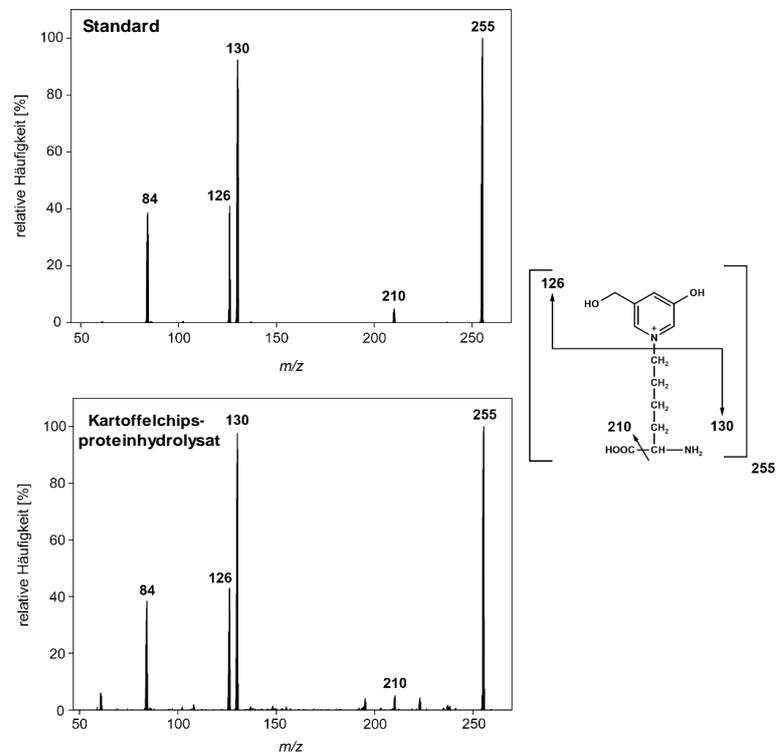
OP-Lysin			DPL		
HR-MS [M] ⁺		225,1234	HR-MS [M + H] ⁺		221,2708
berechnet C ₁₁ H ₁₇ O ₃ N ₂		225,1239	berechnet C ₉ H ₂₀ O ₄ N ₂		221,2714
H/C	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]	H/C	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
2	8,24 (s, 1H)	132,3	1	3,09 (t, 2H) ³ J = 6,9 Hz	48.6
3	-	156,7	2	1,81 (m, 2H)	26.4
4	7,80 (d, 1H) ³ J = 5,8 Hz	128,6	3	1,59 (m, 2H)	23.2
5	7,72 (t, 1H) ³ J = 8,6 Hz ³ J = 5,8 Hz	131,8	4	2,01 (m, 2H)	30.9
6	8,20 (d, 1H) ³ J = 8,6 Hz	135,6	5	4,02 (t, 1H) ³ J = 6,2 Hz	53.6
1'	4,40 (t, 2H) ³ J = 7,4 Hz	61,2	6	-	171.6
2'	1,92 (m, 2H)	29,8	1'	3,03 (dd, 1H) ² J = 12,9; ³ J = 3,1 Hz	21.0
3'	1,37 (m, 2H)	20,9	2'	3,20 (dd, 1H) ² J = 12,8; ³ J = 3,0 Hz	68.5
4'	1,82 (m, 2H)	28,9	3'	3,96 (m, 1H) 3,55 (dd, 1H) ² J = 11,4; ³ J = 5,6 Hz	65.1
5'	3,91 (t, 1H) ³ J = 6,4 Hz	52,4	3'	3,61 (dd, 1H) ² J = 11,3; ³ J = 4,8 Hz	
6'	-	171,6			

13.1.2 CID-Spektren

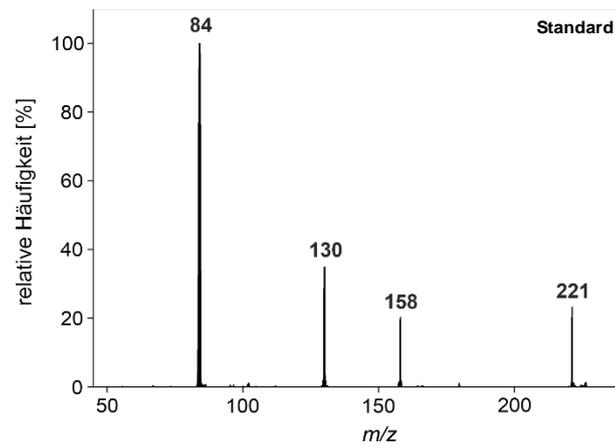
HOP-Lysin:



GLAP:

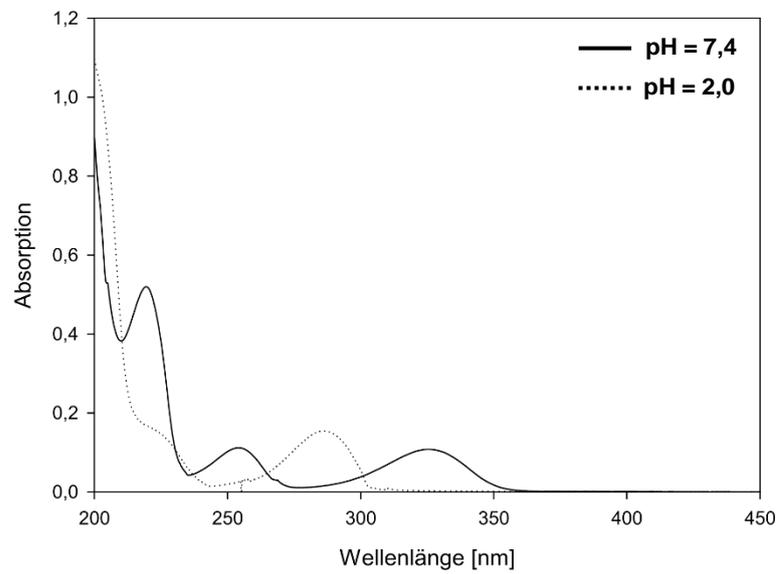


DPL:

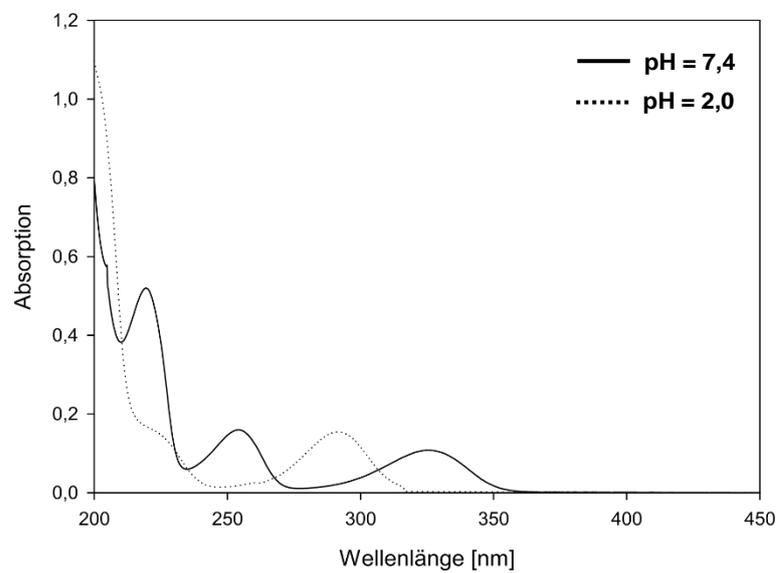


13.1.3 UV-Spektren

GLAP:



HOP-Lysin:



13.2 Chromatographische Methoden

13.2.1 LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Proteinmodifikationen

Parameter			
Säule	Waters Xselect HSS T3; 5 μ m; 250x3,0 mm		
Laufmittel	A: H ₂ O + 1,2 mL/L HFBA B: MeOH/H ₂ O (70:30) + 1,2 mL/L HFBA		
Gradient	Zeit	Anteil A	Anteil B
	[min]	[%]	[%]
	2	98	2
	12	86	14
	34	13	87
	34,5	0	100
	41,5	0	100
	44	98	2
	52	98	2
Fluss	0,7 mL/min		
Temperatur	25 °C		
Injektionsvolumen	10 μ L		
Dauer	52 min		

Parameter	
Sprayer capillary voltage	2,5 kV
Nebulizing gas	70 mL min ⁻¹
Curtain gas	40 mL min ⁻¹
Heating gas	80 mL min ⁻¹
Temperatur	650 °C
Detektion	MRM-Modus

13.2.2 LC-MS/MS-Methode zur Detektion von NDPO₂

Parameter			
Säule	VYDAC 218TP54, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 µm, Hesperia, CA		
Laufmittel	A: H ₂ O + 0,8 mL/L Ameisensäure B: MeOH/H ₂ O (70:30) + 0,8 mL/L Ameisensäure		
Gradient	Zeit	Anteil A	Anteil B
	[min]	[%]	[%]
	5	70	30
	15	30	70
	25	0	100
	30	0	100
	35	70	30
	40	70	30
Fluss	1,0 mL/min		
Temperatur	25 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		
Dauer	40 min		

13.2.3 HPLC-Methode zur Anreicherung von GLAP und OP-Lysin

Parameter			
Säule	VYDAC 218TP54, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 µm, Hesperia, CA		
Laufmittel	A: H ₂ O + 1,2 mL/L HFBA B: MeOH/H ₂ O (70:30) + 1,2 mL/L HFBA		
Gradient	Zeit	Anteil A	Anteil B
	[min]	[%]	[%]
	5	95	5
	30	90	10
	35	0	100
	40	0	100
	45	95	5
	50	95	5
Fluss	1,0 mL/min		
Temperatur	25 °C		
Injektionsvolumen	30 µL		
Dauer	50 min		

13.2.4 HPLC-Methode zur Anreicherung von *meta*-DLP

Parameter			
Säule	VYDAC 218TP54, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 µm, Hesperia, CA		
Laufmittel	A: H ₂ O + 1,2 mL/L HFBA B: MeOH/H ₂ O (70:30) + 1,2 mL/L HFBA		
Gradient	Zeit	Anteil A	Anteil B
	[min]	[%]	[%]
	5	80	20
	30	75	25
	35	0	100
	40	0	100
	45	80	20
50	80	20	
Fluss	1,0 mL/min		
Temperatur	25 °C		
Injektionsvolumen	30 µL		
Dauer	50 min		

13.2.5 HPLC-Methode zur Quantifizierung von Ribose

Parameter			
Säule	Eurosphere-100, 250 mm × 30 mm, RP18, 5 µm		
Laufmittel	A: H ₂ O + 0,6 mL/L HFBA B: MeOH/H ₂ O (70:30) + 0,6 mL/L HFBA		
Gradient	Zeit	Anteil A	Anteil B
	[min]	[%]	[%]
	0	80	20
	35	55	45
	50	0	100
	60	0	100
	65	80	20
75	80	20	
Fluss	1,0 mL/min		
Temperatur	25 °C		
Injektionsvolumen	10 µL		
Dauer	75 min		

13.2.6 MS/MS-Übergänge der Proteinmodifikationen

Analyt	Retentionszeit [min]	Molekülion [Da]	Massenfragment [Da]	DP [V]	CE [eV]	CXP [V]
<i>N</i> ⁶ -Acetyllysin	15,5	189,2	143,1	40,0	14,0	10,0
			126,1		18,0	10,0
			84,2		31,0	5,0
<i>N</i> ⁶ -Formyllysin	12,1	175,1	129,1	40,0	15,0	13,0
			112,1		20,0	13,0
			84,1		35,0	7,0
<i>ortho</i> -Tyrosin	26,7	182,1	136,2	35,0	18,0	24,0
			119,1		27,0	6,0
			91,1		42,0	4,5
CML	9,9	205,1	130,2	42,0	17,0	9,0
			84,1		30,0	14,0
			56,1		59,0	9,0
CEA	23,7	247,1	132,1	51,0	24,0	10,0
			116,2		25,0	10,0
			70,2		48,0	11,0
CEL	16,2	219,1	130,1	54,0	18,0	11,0
			84,1		33,0	7,0
			56,1		59,0	8,0
HEL	15,5	191,2	130,2	42,0	18,0	23,0
			84,0		28,0	6,0
			56,2		56,0	4,0
GOLD	27,0	327,2	282,3	60,0	31,0	14,0
			198,1		28,0	14,0
			84,1		51,0	13,0
MOLD	28,2	341,3	296,3	45,0	33,0	18,0
			212,300		31,0	17,0
			84,200		52,0	14,0
MG-H1/H3	22,6	229,2	116,1	45,0	21,0	9,0
			114,2		21,0	9,0
			70,2		45,0	11,0
GH-3	18,5	215,1	116,2	48,0	20,0	10,0
			100,1		20,0	8,0
			70,1		38,0	11,0
DPL	11,7	221,300	158,0	45,0	30,0	12,0
			130,2		22,0	11,0
			84,2		37,0	14,0
Furosin	25,0	255,2	192,0	50,0	33,0	7,0
			130,3		21,0	10,0
			84,1		23,0	12,0
Pyrralin	25,5	255,2	273,2	38,0	12,0	13,0
			175,2		17,0	17,0
			148,3		29,0	10,0

13.3 Charakterisierung Kartoffelchips

Probennummer	Handelsmarke	Produktbezeichnung
P 01	funny-frisch	Riffels Naturell
P 02	Lays	Gesalzen
P 03	Gut und Günstig	Chips for Friends geriffelt gesalzen
P 04	Lorenz	Crunchips Salted
P 05	Clarkys	Kartoffel Chips gesalzen
P 06	Clarkys	Light Chips gesalzen & geriffelt
P 07	Chio	Ready Salted Chips
P 08	ja!	Salted Chips
P 09	K-CLASSIC	Knusprige Chips Salz
P 10	Penny	Chips Kartoffelchips mit Salz
P 11	real Quality	Kartoffelchips Gesalzen
P 12	Sun Snacks	Chips Salz
P 13	Snack Day	Salz Chips
P 14	Snack Day	Salz Crinkle Cut
P 15	Lays	light Gesalzen
P 16	K-CLASSIC	light Geriffelte Salz Chips
P 17	Heimatgut	Meersalz Kartoffel Chips
P 18	dennree	Kartoffel Chips Gesalzen
P 19	funny-frisch	Kessel Chips Sea Salt
P 20	Lorenz	Naturals Fein gesalzen leicht

14 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Robert Johannes Rau
Geburtsdatum/-ort	
Familienstand	ledig

Beruflicher Werdegang

seit 09/2023	Mitarbeiter Forschung und Entwicklung, Eurofins Food & Feed Testing Leipzig GmbH, Leipzig
11/2022-04/2023	Prüfleiter, Wolfener Analytik GmbH, Bitterfeld-Wolfen
07/2018-06/2022	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittelchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. M. A. Glomb

Ausbildung

10/2013-04/2018	Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemiker mit dem Prädikat sehr gut (1,1)
07/2013	Abitur am Friedrich Schiller Gymnasium Calbe/Saale

15 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Synthese, Charakterisierung und Nachweis neuartiger Pyridinium-Proteinmodifikationen“ selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Datum, Unterschrift