

## Die Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper – neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin

Von Franz Ledl\* und Erwin Schleicher\*

*Professor Otto H. Wieland zum 70. Geburtstag  
und Professor Theodor Severin zum 60. Geburtstag gewidmet*

Die beim Kochen, Backen und Konservieren stattfindenden Reaktionen sind von großer Bedeutung für den Geruch, den Geschmack und das Aussehen von Lebensmitteln. In neueren Untersuchungen wurde festgestellt, daß derartige Reaktionen auch zu Nährwertminderungen und zur Bildung von toxischen Verbindungen führen können. Ein wichtiges Beispiel ist die als nichtenzymatische Bräunung oder Maillard-Reaktion bekannte, sehr komplex ablaufende Reaktion zwischen reduzierenden Zuckern und freien Aminogruppen von Aminosäuren oder Proteinen. Einen prinzipiell neuen Aspekt bekam die Maillard-Reaktion, als bekannt wurde, daß sie auch im menschlichen Körper abläuft. Allgemein gilt, daß um so größere Mengen an Maillard-Produkten gefunden werden, je länger die Halbwertszeit des beteiligten Proteins ist, d. h. je „älter“ das Protein im Körper wird, und je höher die Glucosekonzentration, z. B. bei Diabetikern, ist. Da viele Diabetes-Spätschäden einer frühzeitigen Alterung ähneln, wäre es denkbar, daß die Glucose durch Reaktion mit Proteinen das langsam fortschreitende Altern mitverursacht.

### 1. Einleitung

Erste umfangreiche Untersuchungen der Reaktion von reduzierenden Zuckern mit Aminosäuren wurden von *Maillard*<sup>[1]</sup> vor 78 Jahren durchgeführt. *Amadori*<sup>[2]</sup> berichtete in der Folgezeit von der Bildung zweier Reaktionsprodukte, die von ihm als stabiles bzw. instabiles Isomer bezeichnet wurden. *Kuhn* und *Weygand* konnten später zeigen, daß zunächst ein Glycosylamin (labiles Isomer) gebildet wird, das sich zur Aminoketose (stabiles Isomer) umlagert<sup>[3]</sup>. Mit der Aufklärung des Reaktionsmechanismus beschäftigten sich *Simon* und *Kraus*<sup>[4]</sup>. Über die entsprechenden Reaktionen von Ketosen mit Aminosäuren unter Bildung von Aminoaldosen

berichteten *Heyns* et al.<sup>[5]</sup>. Weitere Beiträge zum Verständnis der in der „frühen“ Phase der Maillard-Reaktion ablaufenden Prozesse kamen unter anderem aus den Arbeitskreisen von *Hodge*, *Anet*, *Heyns*, *Micheel* und *Kato*<sup>[6]</sup>. In den folgenden Abschnitten wird anhand von neueren Ergebnissen die Bedeutung der Maillard-Reaktion für Lebensmittel und für den menschlichen Organismus aufgezeigt<sup>[7]</sup>.

### 2. Reaktionswege

#### 2.1. Vorbemerkungen

Die Maillard-Reaktion oder nichtenzymatische Bräunung bezeichnet nicht nur eine, sondern eine Vielzahl von verschiedenartigen Reaktionen. Entsprechend erhält man bei der Umsetzung von Zuckern mit Aminen ein außerordentlich komplexes Gemisch von Verbindungen, die in sehr unterschiedlichen Mengen vorliegen. Neben Substanzen, die in

[\*] Prof. Dr. F. Ledl  
Institut für Lebensmittelchemie und Analytische Chemie der Universität  
Pfaffenwaldring 55, D-7000 Stuttgart 80  
Dr. rer. nat. habil. E. Schleicher  
Institut für Klinische Chemie und Institut für Diabetesforschung  
am Städtischen Krankenhaus München-Schwabing  
Kölner Platz 1, D-8000 München 40

hohen Ausbeuten (bis zu 30%) gebildet werden, entstehen Verbindungen, deren Konzentrationen im ppb-Bereich und darunter liegen. Anders als in der präparativen Chemie wird hier die Bedeutung eines Produkts nicht so sehr durch die Ausbeute, sondern durch die Wirkung (z. B. Geruch, Geschmack) bestimmt. So kann das Aroma eines erhitzten Lebensmittels bereits durch einige  $\mu\text{g}$  einer Verbindung geprägt sein. Das Mengenverhältnis der Reaktionsprodukte ist starken Schwankungen unterworfen, es hängt wesentlich von den Umsetzungsbedingungen ab. Einen großen Einfluß haben unter anderem die Reaktionszeit, die Temperatur, die Konzentration der Reaktionspartner und der pH-Bereich. Diese Faktoren bewirken z. B., daß sich gekochtes von gebratenem Fleisch im Aroma, Aussehen und Geschmack unterscheidet.

Obwohl inzwischen viele Ergebnisse über den Ablauf der Maillard-Reaktion vorliegen, ist es nicht möglich, ein vollständiges Reaktionsschema zu präsentieren. Bekannt sind überwiegend stabile Umsetzungsprodukte, die weder im Reaktionsgemisch in größerem Umfang Folgereaktionen eingehen noch sich während der Isolierung und Reinigung verändern oder zersetzen. Solche Verbindungen können als Indikatorsubstanzen zum Nachweis bestimmter Reaktionsabläufe bei der Maillard-Reaktion dienen. Große Schwierigkeiten bereitet die Abtrennung von reaktiven Zwischenprodukten, da sie nur in sehr geringen Konzentrationen im Umsetzungsgemisch vorliegen und meist während der Isolierung weiterreagieren. Doch gerade diese Verbindungen sind für die Maillard-Reaktion von größter Bedeutung, da sie wesentlich an der Bildung von Bräunungsprodukten, Aromastoffen, hochmolekularen Substanzen usw. beteiligt sind.

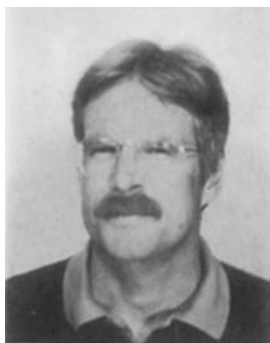
In der folgenden Zusammenstellung wird versucht, die Reaktionsabläufe bei der Maillard-Reaktion zu beschreiben, ohne daß dabei auf die oft verwirrenden Einzelheiten eingegangen wird. Dies hat zur Folge, daß einige Untersuchungsergebnisse nicht oder nur teilweise berücksichtigt

sind, ohne daß dadurch ihre Bedeutung geschmälert werden soll.

## 2.2. Ausgangsverbindungen

In Lebensmitteln reagieren im wesentlichen die Monosaccharide Glucose und Fructose, die Disaccharide Maltose und Lactose sowie in einigen Fällen (z. B. Fleisch) reduzierende Pentosen mit Aminosäuren und/oder Proteinen. Glycosidisch verknüpfte Zucker in Glycoproteinen, Glycolipiden, Flavonoiden oder in Disacchariden wie Saccharose beteiligen sich an der Maillard-Reaktion erst nach Spaltung der glycosidischen Bindung. Hexuronsäuren verhalten sich, soweit sie überhaupt frei vorkommen, wie Pentosen, d. h. im Verlauf der Maillard-Reaktion kommt es zur Decarboxylierung. In speziellen Produkten (z. B. Käse) können biogene Amine als Aminkomponente reagieren. Eine Sonderstellung nimmt Ammoniak ein, der in geringem Umfang während der Maillard-Reaktion aus Aminosäuren gebildet werden kann (vgl. Abschnitt 2.7.1) und der in großen Mengen zur Herstellung von bestimmten Zuckercoulouren eingesetzt wird.

Im menschlichen Körper ist bisher vor allem die Reaktion der Glucose mit freien Aminogruppen von Proteinen als Aminkomponente untersucht worden. Neuere Ergebnisse lassen erkennen, daß daneben auch Fructose und Pentosen als Zuckerkomponenten eine Rolle spielen (vgl. Abschnitte 4.2 und 4.5). Generell sind für die Maillard-Reaktion primäre Amine wesentlich wichtiger als sekundäre. So reagieren in Proteinen überwiegend die primären  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysinseitenketten. Ferner dominieren die primären Aminosäuren, soweit sie in Lebensmitteln in freier Form vorkommen. Allerdings findet man in Getreide und Getreideprodukten (Malz, Bier) die sekundäre Aminosäure Prolin in beträchtlichen Mengen, so daß wegen der Bedeutung dieser Grundnahrungsmittel in der Ernährung auf das Verhalten



*Franz Ledl, geboren 1946 in Starnberg, studierte von 1965–1970 Lebensmittelchemie an der Universität München und promovierte dort 1973 bei T. Severin. Nach der Habilitation 1987 wurde er 1989 C4-Professor am Institut für Lebensmittelchemie und Analytische Chemie an der Universität Stuttgart. Sein Arbeitsgebiet umfaßt verschiedene Bereiche der Maillard-Reaktion in Lebensmitteln und in vivo.*



*Erwin Schleicher, geboren 1946 in Bamberg, studierte von 1968–1972 Chemie und promovierte 1974 bei H. Simon an der Technischen Universität München. Nach einem Post-doc-Aufenthalt von 1975–1976 bei H. G. Floss an der Purdue University (Indiana, USA) beschäftigte er sich im Arbeitskreis von H. Simon mit dem Mechanismus von enzymkatalysierten Redoxreaktionen. Seit 1977 arbeitete er mit O. H. Wieland an den Instituten für Klinische Chemie und Diabetesforschung am Krankenhaus München-Schwabing, und 1986 habilitierte er sich an der TU München. Arbeitsschwerpunkte sind Untersuchungen zur Beziehung zwischen Struktur und Funktion von Glycoproteinen sowie Untersuchungen zum Signaltransfer durch Zellmembranen.*

der sekundären Amine bei der Maillard-Reaktion ebenfalls eingegangen wird.

## 2.3. Modellreaktionen

In natürlichen Systemen erschwert die Fülle an Reaktionspartnern und weiteren Inhaltsstoffen die Trennung, Isolierung und Reinigung der Maillard-Produkte erheblich. Es hat sich aber gezeigt, daß die Verhältnisse und Bedingungen in Lebensmitteln und im Organismus mit Modellumsetzungsgemischen simulierbar und daß die Ergebnisse übertragbar sind. Die Kenntnisse über die in den Abschnitten 2.4 bis 2.8 dargestellten Reaktionsabläufe stammen überwiegend aus solchen Untersuchungen.

### 2.3.1. Beschreibung von Modellsystemen

Zur Simulation der in Lebensmitteln und in vivo vorliegenden Verhältnisse werden in der Regel wäßrige Lösungen der Zucker- und Amin-Komponenten untersucht. Zum Studium der Röstvorgänge eignen sich die Schmelzen der Reaktionspartner. Geht man davon aus, daß die Zucker und die Amine in sehr unterschiedlichen Mengen in den Lebensmitteln enthalten sind, dann ergibt sich daraus bereits eine Vielzahl von Modellsystemen. Darüber hinaus muß beachtet werden, daß bei einigen Herstellungs-, Verarbeitungs- und Zubereitungsverfahren Konzentrationsprozesse ablaufen. So ist bekannt, daß beim Trocknen von Lebensmitteln oft ein für den Ablauf der Maillard-Reaktion optimaler Konzentrationsbereich durchlaufen wird.

Von zentraler Bedeutung für die Produktbildung sind Reaktionsdauer und Temperaturbereich. Als Faustregel gilt, daß sich der Umsatz mindestens verdoppelt, wenn die Temperatur um 10 °C erhöht wird (bis zu sechsfache Umsatzsteigerungen wurden gemessen). Nimmt man die Braunfärbung einer Reaktionslösung als Maß für den Fortgang der Maillard-Reaktion, so erhält man annähernd gleiche Werte nach vier Wochen bei 20 °C, drei Stunden bei 100 °C und fünf Minuten bei 150 °C.

Die Modellsysteme sind überwiegend auf pH-Werte zwischen 4 und 7.5 gepuffert.

Zur Simulation der Verhältnisse im menschlichen oder tierischen Organismus wird die Zuckerkomponente Glucose mit der Aminkomponente, z. B. einem Protein, bei pH 7.4, 140 mM Natriumchlorid, 5 mM Kaliumchlorid und 37 °C (physiologisches Milieu) inkubiert; das Gemisch wird anschließend gereinigt und analysiert. Die unter diesen Bedingungen am Protein ablaufende Maillard-Reaktion kann durch Fluoreszenzmessungen verfolgt werden.

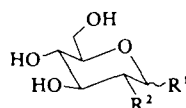
### 2.3.2. Untersuchung von Modellsystemen

Zur Analyse wird die wäßrige Reaktionslösung oder die in Wasser gelöste Reaktionsschmelze vielfach mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert. Die mit der organischen Phase abgetrennten, unpolaren Produkte lassen sich, wenn sie genügend flüchtig sind, gaschromatographisch trennen und mit dem Massenspektrometer identifizieren. Ein Teil der polaren Substanzen ist nach Derivatisierung (Silylierung, Acylierung) ebenfalls gaschromatographisch erfaßbar. Große Schwierigkeiten bereitet die Analyse des übrigen

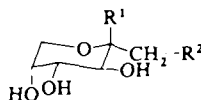
größeren Teils der Reaktionsprodukte. Mit den üblichen Chromatographie-Verfahren (Ausschluß, Ionenaustausch, Adsorption, Verteilung) erhält man Fraktionen, aus denen meist erst nach mehrmaliger weiterer Auftrennung Reinsubstanzen gewonnen werden können. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ermöglicht eine reproduzierbare Fraktionierung und erleichtert mit verschiedenen Detektionsmethoden (UV, Fluoreszenz, elektrochemisch usw.) die Zuordnung bestimmter Substanzen oder Substanzklassen. Für spezielle Fragestellungen zum Reaktionsmechanismus oder zur Aufklärung neuer Reaktionswege werden sowohl radioaktiv als auch mit stabilen Isotopen markierte Ausgangsverbindungen verwendet. In den folgenden Abschnitten wird bei einigen Maillard-Produkten auf die Analytik eingegangen; es sind auch Beispiele für Derivatisierungs- und Abfangreagentien zu finden. Einige Probleme bei der Untersuchung von Protein-Zucker-Umsetzungsgemischen werden im Abschnitt 4.3 aufgezeigt.

## 2.4. Anfangsphase

Die Formelschemata zeigen am Beispiel der Glucose den Zuckerabbau der Hexosen; auf Abweichungen bei Pentosen oder Disacchariden wird hingewiesen. Zur Vereinfachung sind meist die offenkettigen Strukturen gezeichnet. Tatsächlich liegen die Zucker und viele Folgeprodukte überwiegend in der cyclischen Halbacetalform vor. Zur Verdeutlichung sind daher die Strukturen einiger Ausgangsverbindungen und Primärprodukte vorangestellt (Schema 1).



$R^1 = R^2 = \text{OH}$ : D-Glucose  
 $R^1 = \text{NHR}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ : D-Glucosylamin 1 (stets  $\beta$ -Form)  
 $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{NHR}$ : 2-Amino-2-desoxy-D-glucose 2 (Heyns-Produkt)



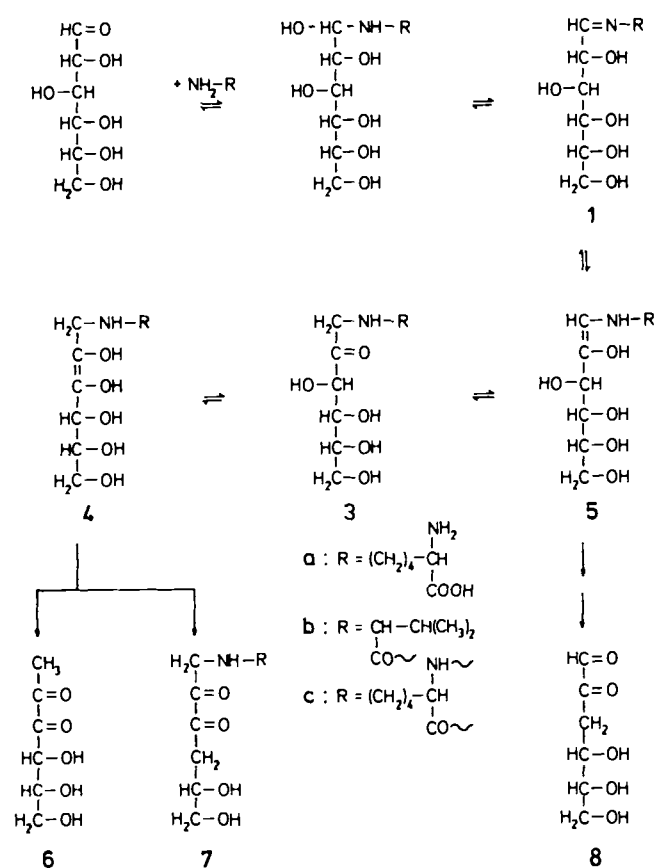
$R^1 = R^2 = \text{OH}$ :  $\beta$ -D-Fructopyranose  
(neben  $\alpha$ -Form und Furanosen)  
 $R^1 = \text{NHR}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ :  $\beta$ -D-Fructosylamin  
(nicht isolierbar mit aliphatischen Aminen)  
 $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{NHR}$ : 1-Amino-1-desoxy- $\beta$ -D-fructose 3  
(Amadori-Produkt; neben  $\alpha$ -Form und Furanosen)

Schema 1.

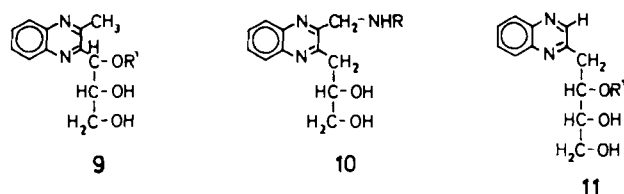
### 2.4.1. Amine als Nucleophile

Amine addieren sich als Nucleophile unter Bildung von Glycosylaminen an die Carbonylfunktionen von Zuckern. Verhältnismäßig stabile Glycosylamine des Typs 1 erhält man mit aromatischen und heterocyclischen Aminen, z. B. Purinen. Eine biologisch sehr weit verbreitete derartige Verbindung ist Adenosintriphosphat. Glycosylamine aus Aminosäuren oder aliphatischen Aminen können in der Regel in Zucker-Amin-Umsetzungsgemischen nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. Sie reagieren schnell weiter

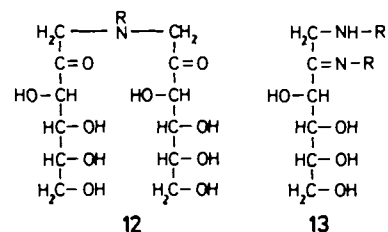
Als Abbauprodukte der Aminoketosen im pH-Bereich 4–7 findet man Desoxydiketosen und -aldoketosen: Über das Endiol **4** bzw. das Aminoenol **5** entstehen die 1-Desoxy-2,3-hexodiulose **6**, die 1-Amino-1,4-didesoxy-2,3-hexodiulose **7** und die 3-Desoxy-2-hexosulose **8**. Zum Nachweis der Um-



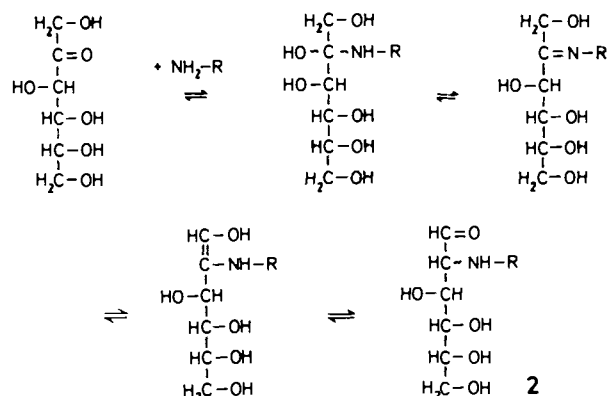
wandlung von **3** in diese Produkte ist die Abfangreaktion mit *o*-Phenylendiamin zu den entsprechenden Chinoxalinen **9**, **10** bzw. **11** geeignet<sup>[12]</sup>. (Mit dem Rest R' bei den Chinoxalinen **9** und **11** soll darauf hingewiesen werden, daß beim Abbau der Amadori-Verbindungen von Disacchariden die gly-



Neben den Aminoketosenen **3** werden auch Verbindungen vom Typ **12**<sup>[13]</sup> und **13**<sup>[14]</sup> gebildet. Letztere sind auch als Zwischenprodukte bei der Osazonbildung bekannt.

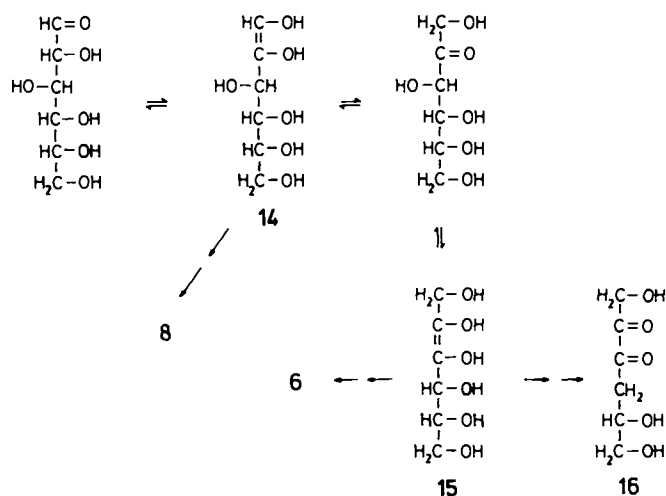


Ketosen reagieren mit Aminen über Imine als Intermediate zu Aminoaldosen wie **2** (Heyns-Produkten)<sup>[15]</sup>. In der Natur verläuft ein Teilschritt der Biosynthese von *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin ebenfalls nach diesem Prinzip: Fructose reagiert mit Ammoniak und lagert sich über die Schiffsche Base zum aktivierten Glucosamin bzw. Galactosamin um. Verbindungen des Typs **2** sind nicht sehr



stabil; in Folgereaktionen entstehen unter anderem Amadori-Verbindungen<sup>[16]</sup>. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß Aminoaldosen auch im menschlichen Körper gebildet werden. Man kann annehmen, daß Amadori- und Heyns-Verbindungen ähnlich abgebaut werden. In Gegenwart von *o*-Phenylendiamin erhält man aus letzteren überwiegend das Chinoxalin **11** über **8** als Intermediat<sup>[17]</sup>. Gerade im Hinblick auf die in-vivo-Bildung der Heyns-Produkte sind allerdings noch weitere Untersuchungen über deren Eigenschaften nötig (vgl. Abschnitt 4.2).

Als Basen oder Säuren (je nach vorgegebenem pH-Bereich) katalysieren die Amine die Wanderung der Carbonylgruppe der Zucker, d.h. Aldosen werden in Ketosen umgewandelt und umgekehrt; entsprechendes gilt für Imine und Aminoketosen bzw. Aminoaldosen (vgl. Abschnitt 2.4.1) (Lobry-de-Bruyn-van-Ekenstein-Umlagerung). Durch Wasserabspaltung entstehen aus den Endiolen **14** und **15** die



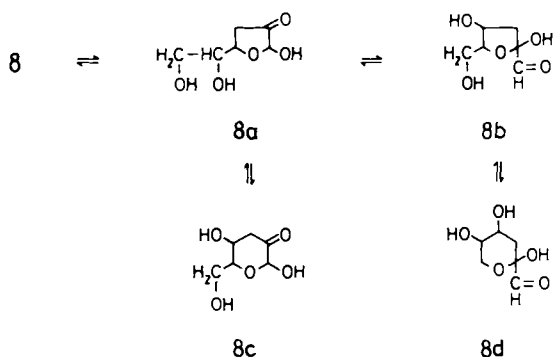
3-Desoxy-2-hexosulose **8** bzw. die 1-Desoxy-2,3-hexodiulose **6** und die 4-Desoxy-2,3-hexodiulose **16**. Beim Erhitzen der Zucker in Abwesenheit von Aminen beobachtet man diese Reaktionsfolge bei pH-Werten unter 3<sup>[18]</sup> und über 8<sup>[19]</sup> oder beim Karamelisieren, d.h. bei Temperaturen über 130 °C. Die Bedeutung der Amine bei der Bildung der Verbindungen **6–8** und **16** liegt also darin, daß sie die Zuckermumwandlung im für Lebensmittel und lebende Organismen üblichen pH-Bereich (4–7) katalysieren.

## 2.5. Desoxyaldoketosen und -diketosen

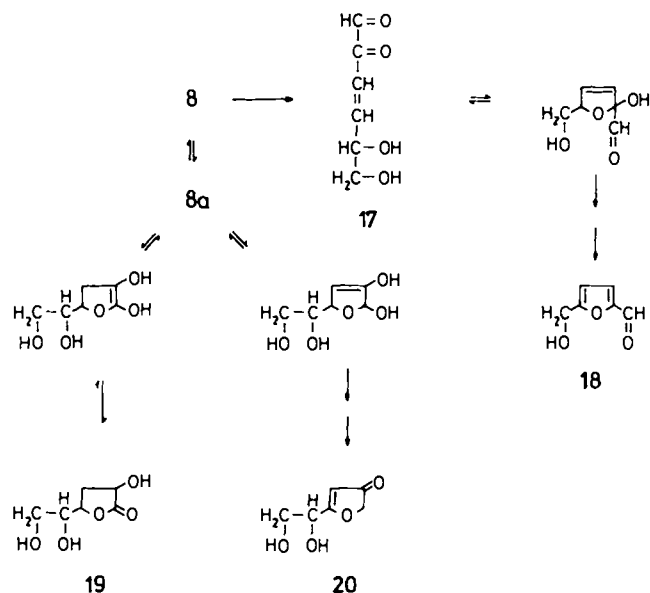
Soweit man heute weiß, verlaufen viele wichtige Folgereaktionen der Zucker bei der Maillard-Reaktion über Desoxyaldoketosen oder -diketosen als Zwischenstufen. Man kann diese Verbindungen als intramolekulare Disproportionierungsprodukte des Zuckers bezeichnen, die wesentlich schneller als die Ausgangsverbindung weiterreagieren; dabei spielen Enolisierungen, Cyclisierungen und Wasserabspaltungen eine große Rolle. Die Anwesenheit von Aminen führt zusätzlich zur Bildung N-haltiger Verbindungen. Produkte, die unter Spaltung der ursprünglichen Zuckerkette entstehen, sind in einem gesonderten Abschnitt zusammengefaßt.

### 2.5.1. Abbau der 3-Desoxyaldoketosen

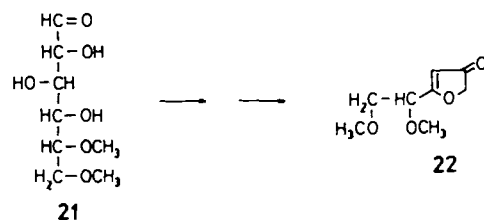
3-Desoxyhexosulosen **8** wurden vor 30 Jahren erstmals in Umsetzungsgemischen von Zuckern und Aminen nachgewiesen<sup>[20]</sup>. Man kann davon ausgehen, daß in Lösung ein Gleichgewicht der cyclischen Formen **8a** bis **8d** vorliegt. Das



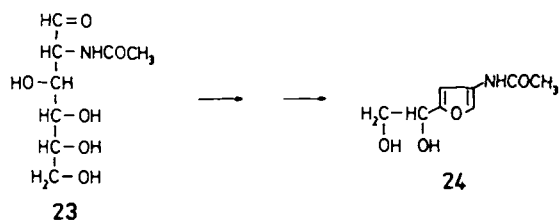
wohl bekannteste Folgeprodukt dieser Verbindungen ist das Hydroxymethylfurfural **18**<sup>[21]</sup>. In Gegenwart von Aminen kann die Bildung von **18** zugunsten N-haltiger Verbindungen eingeschränkt sein. Bemerkenswert ist der Nachweis des Metasaccharinsäurelactons **19**<sup>[22]</sup>. Im Alkalischen bildet sich Metasaccharinsäure durch Hydridwanderung aus **8**<sup>[19]</sup>. Bei der Maillard-Reaktion im pH-Bereich 4–7 dürfte das Lacton **19** aus der cyclischen Vorstufe **8a** durch Isomerisierung der Ketogruppe entstehen<sup>[23]</sup>. Aus **8a** könnte sich nach Enolisierung zum C3-Atom und anschließender Eliminierung



der Hydroxygruppe aus der Halbacetalfunktion das Furanon **20** bilden; es wurde aber noch nicht nachgewiesen. Bekannt ist die Umwandlung der 5,6-Dimethoxyglucose **21** in die entsprechende Verbindung **22**<sup>[24]</sup>. Das strukturell ver-

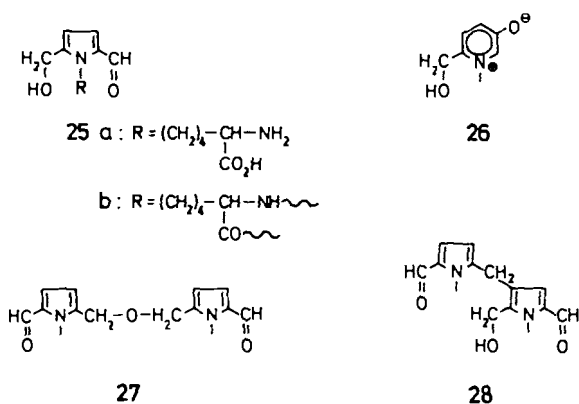


gleichbare Aminofuran **24** wird als Hauptprodukt erhalten, wenn *N*-Acetylglucosamin **23** in Gegenwart von Aminen erhitzt wird. Verbindung **24**, schon länger bekannt, dient zum Nachweis für *N*-Acetylglucosamin und *N*-Acetylgalactosamin<sup>[25]</sup> (die Umwandlung erfolgt im Alkalischen). Diese Aminozucker kommen allerdings in der Natur fast aus-

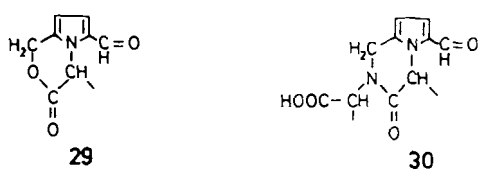


schließlich glycosidisch an Proteine gebunden vor und scheiden damit als Ausgangsverbindungen für die Maillard-Reaktion aus.

Bei der Maillard-Reaktion der 3-Desoxyhexosulosen **8** kann in Gegenwart größerer Mengen primärer Amine die Bildung des Hydroxymethylfurfurals **18** weitgehend unterbleiben. Man findet statt dessen Pyrrolaldehyde der Struktur **25**<sup>[26]</sup> sowie Pyridiniumbetaine des Typs **26**<sup>[27]</sup>. Die Tatsache, daß sich **25** und **26** aus Hydroxymethylfurfural und Aminen nur in sehr schlechten Ausbeuten herstellen lassen, weist darauf hin, daß das Amin bereits in eine Vorstufe von **18** eingebaut wird. Weitere N-haltige Folgeprodukte der Verbindung **8** sind die Bispyrrole **27** und **28**<sup>[28]</sup>. Die Strukturen



machen eine Dimerisierung des Pyrrolaldehyds **25** wahrscheinlich, dessen Hydroxymethyl-OH-Gruppe leicht nucleophil substituiert wird (vgl. Abschnitt 4.5). In Gegenwart von Aminosäuren findet man darüber hinaus Lactone wie **29**<sup>[29]</sup> und Lactame wie **30**<sup>[22]</sup>. Zur Bildung dieser Bicyclen

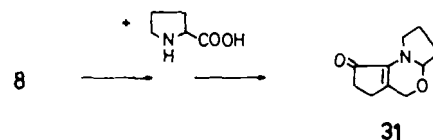


wird ebenfalls die Hydroxygruppe des Pyrrolaldehyds **25** durch andere Nucleophile ersetzt. In Proteinen sind die N-haltigen Produkte überwiegend über die ε-Aminogruppe von Lysin mit der Peptidkette verbunden. Zum Nachweis des Pyrrolaldehyds **25b** ist ein ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)-Test entwickelt worden<sup>[30]</sup>. Man kann auch den Lysylpyrrolaldehyd **25a** nach alkalischer oder enzymatischer Proteinhydrolyse mit HPLC an Umkehrphasen bestimmen<sup>[31]</sup>.

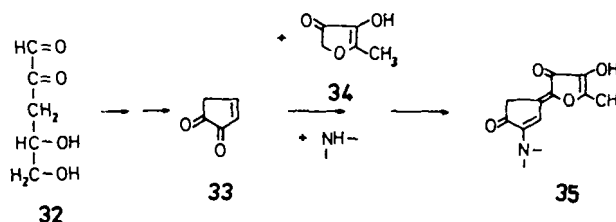
Die Monosaccharidderivate **25** und **26** erhält man auch durch Reaktion von Maltose und Lactose mit primären Aminen. Dies wird aus der Struktur des Zwischenprodukts **17** verständlich, denn zu dessen Bildung wird das O-Atom an C4 zusammen mit dem Glucosylrest der Maltose bzw. dem Galactosylrest der Lactose abgespalten. Pentosen reagieren über die 3-Desoxyaldoketose zu den entsprechenden Pyrrolen **25**<sup>[32]</sup> und Pyridiniumbetainen **26**<sup>[27]</sup> (die Hydroxyme-

thylgruppe in den Strukturen **25** und **26** ist hier durch ein Wasserstoffatom zu ersetzen).

In Umsetzungsgemischen von reduzierenden Zuckern mit sekundären Aminen findet man das Hydroxymethylfurfural **18** in der Regel nicht oder nur in geringen Konzentrationen. Wird die sekundäre Aminosäure Prolin mit **8** erhitzt, läßt sich Malzoxazin **31** als Hauptprodukt aus dem Umsetzungs-

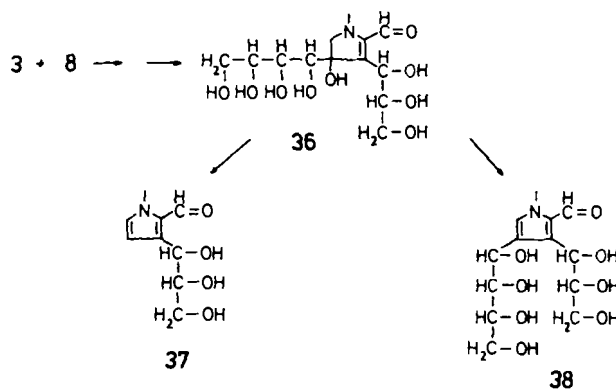


gemisch abtrennen. Malzoxazin ist ein flüchtiger Bestandteil des Malzes und des Bieres, auf dessen Bildung in Abschnitt 2.8.2 eingegangen wird<sup>[33]</sup>. Die Reaktion von sekundären Aminen und Pentosen liefert unter anderem das orangefarbige Kondensationsprodukt **35**<sup>[34]</sup>. Auf die Bildung des Hydroxyfuranons **34** wird noch eingegangen. Verbindung **35** erhält man in Gegenwart von **34** und sekundären Aminen aus der 3-Desoxy-2-pentosulose **32** in guten und aus dem Cyclopentendion **33** in sehr guten Ausbeuten. Die Substanzen **31** und **35** sind Beispiele dafür, daß 3-Desoxyaldoketosen

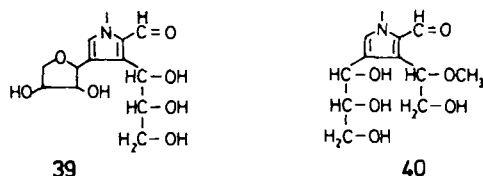


mit sekundären Aminen carbocyclische Folgeprodukte bilden. Dieses Reaktionsprinzip findet man, wie noch gezeigt wird, immer wieder. Generell gilt, daß Zucker in Gegenwart von sekundären Aminen in zum Teil beträchtlichem Umfang in carbocyclische Verbindungen umgewandelt werden.

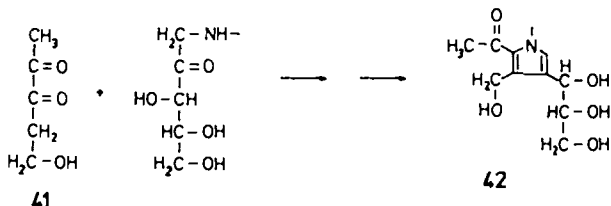
3-Desoxyaldoketosen sind an der Bildung weiterer Pyrrolaldehyde beteiligt. So entstehen die Verbindungen **37** und **38** bei der Reaktion von **8** mit der Aminoketose **3**. Beide Male fungiert **36** als Zwischenprodukt. Elektronenzug der Formylgruppe führt zur Aldolspaltung und damit zu Verbindung **37**<sup>[35]</sup>. In einer Konkurrenzreaktion induziert die Enaminingruppe die Bildung von **38**<sup>[36]</sup>. Gezeichnet sind die



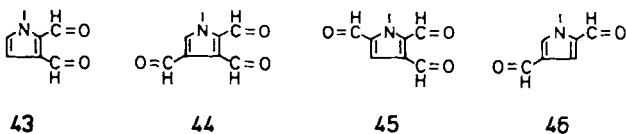
Strukturen der Hexoseprodukte; die Kondensation bei Pentosen verläuft analog<sup>[37]</sup>. Wie schon bei den Pyrrolaldehyden des Typs **25** werden auch bei **37** und **38** die Hydroxygruppen in Nachbarschaft zum Pyrrolring leicht substituiert. Beispiele dafür sind die intramolekulare Reaktion von **38** zu **39** sowie der partielle Austausch von Hydroxy- gegen Methoxygruppen bei der chromatographischen Reinigung (Eluent Methanol/Essigester), wobei z. B. Substanz **40** gebildet wird<sup>[37b]</sup>.



Neben 3-Desoxyaldoketosen findet man auch andere  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen als Reaktionspartner der Aminoketosen. Die Struktur des Pyrrols **42** läßt auf die Mitwirkung der 1,4-Didesoxydiketose **41** schließen<sup>[37b]</sup> (vgl. Abschnitt 3.4). Hinweise auf ähnliche Kondensationsreaktionen ergeben sich aus den Strukturen der Pyrrolaldehyde, die man nach Zusatz von Natriumperodat zu polaren Fraktionen von Glucose- und Pentose-Umsetzungsgemischen mit Alkylaminen erhält. Neben den aus **37** und **38** entstandenen Pyrroldi- und -trialdehyden **43** bzw. **44** sind unter anderem die isomeren Verbindungen **45** und **46** nachweisbar<sup>[37b, c]</sup>.



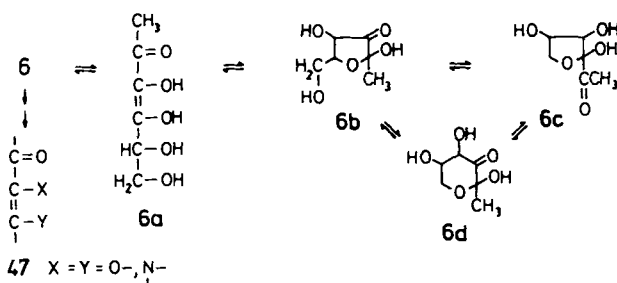
ben sich aus den Strukturen der Pyrrolaldehyde, die man nach Zusatz von Natriumperodat zu polaren Fraktionen von Glucose- und Pentose-Umsetzungsgemischen mit Alkylaminen erhält. Neben den aus **37** und **38** entstandenen Pyrroldi- und -trialdehyden **43** bzw. **44** sind unter anderem die isomeren Verbindungen **45** und **46** nachweisbar<sup>[37b, c]</sup>.



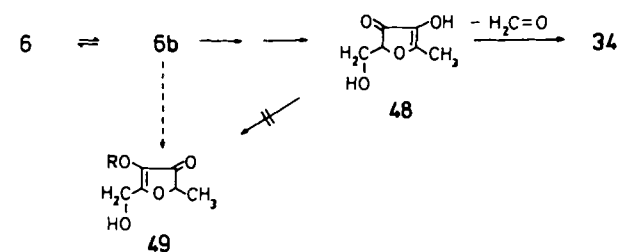
Mit der Isolierung und Identifizierung der Pyrrole **37**, **38** und **42** ist erwiesen, daß Aminoketosen reaktiv genug sind, um Kondensationsreaktionen einzugehen. Auf die Beteiligung weiterer Primärprodukte der Maillard-Reaktion wie Aminoaldosen kann aus den Strukturen der nach Periodatspaltung erhaltenen Pyrrolaldehyde geschlossen werden. Gerade im Hinblick auf die Maillard-Reaktion in vivo ist dies von Interesse, denn hier kann es nach der Pyrrolbildung durch Folgereaktionen, z. B. Substitution der  $\alpha$ -ständigen Hydroxygruppe, zu Quervernetzungen und anderen Veränderungen der Proteinstrukturen kommen (vgl. Abschnitte 4.5 und 5).

## 2.5.2. Abbau der 1-Desoxydiketosen

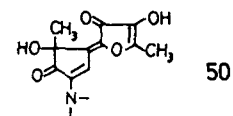
1-Desoxydiketosen konnten erst kürzlich als Folgeprodukte der Aminoketosen nachgewiesen werden<sup>[12a, b]</sup>. Sie werden zu Verbindungen mit der allgemeinen Reduktonstruktur **47** abgebaut (vgl. Abschnitt 3.4). Über das Vorliegen des offenkettigen Reduktons **6a** in Umsetzungsgemischen ist bisher nichts bekannt. Man kann davon ausgehen, daß in Lösung ein Gleichgewicht der cyclischen Formen **6b** bis **6d** vorliegt.



Aus der Halbacetalform **6b** der 1-Desoxydiketose entsteht nach Enolisierung und Wasserabspaltung das Furanon **48**<sup>[38]</sup>, das sich nach Derivatisierung (z. B. Silylierung) gaschromatographisch nachweisen läßt. Bemerkenswert ist, daß **48** unter den Bedingungen der Maillard-Reaktion nur in unbedeutenden Mengen zu Verbindung **49** ( $R=H$ ) isomerisiert.

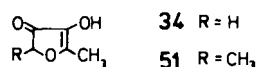


siert. Es kommt statt dessen in beträchtlichem Umfang zur Formaldehydabspaltung und Bildung des Pentosederivats **34**. In diesem Zusammenhang ist die Struktur des farbigen Hauptprodukts **50** aus Umsetzungsgemischen von Hexosen und sekundären Aminen interessant, denn sie enthält als Baustein das Furanon **34** (vgl. Abschnitt 3.3)<sup>[34]</sup>.

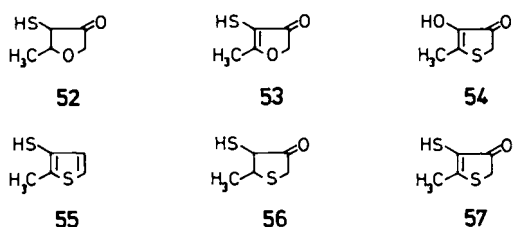


Aus Disacchariden kann das Furanon **48** nur gebildet werden, wenn die glycosidische Bindung gespalten wird. Geht man davon aus, daß bei der Zwischenstufe **6b** die Glycosidbindung erhalten bleibt, dann sollte das Glycosylfuranon **49** ( $R = \alpha\text{-Glu}, \beta\text{-Gal}$ ) entstehen. Der Nachweis dieser Verbindung steht allerdings noch aus.

Aus Pentosen und 6-Desoxyhexosen wie Rhamnose bilden sich über die 1-Desoxydiketosen die entsprechenden Furanone **34**<sup>[39]</sup> und **51**<sup>[40]</sup>. Verbindung **34** spielt eine maßgeb-



liche Rolle bei der Bräunung von Pentosen (siehe Abschnitt 3.3). In Gegenwart von S-haltigen Verbindungen (z. B. Cystein), aus denen beim Erhitzen Schwefelwasserstoff freigesetzt wird, hat **34** auch einen beträchtlichen Einfluß auf die Aromabildung. Es entstehen dabei Substanzen mit interessanten Aromanoten (meist ähnlich erhitztem Fleisch<sup>[41]</sup>; die Verbindungen **52** bis **57** sind als Beispiele angegeben). Die

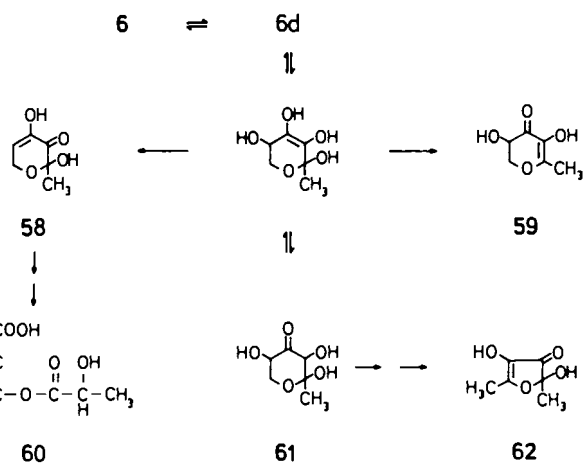


entsprechenden S-haltigen Produkte mit einer weiteren Methylgruppe erhält man aus dem Furanon **51** beim Erhitzen mit Schwefelwasserstoff. Verbindung **51** ist eine Aromasubstanz mit einem sehr niedrigen Geruchsschwellenwert und einer Aromanote (fruchtig-röstig-karamelartig), die als angenehm empfunden wird. Sie wird inzwischen in großen Mengen hergestellt und vielen Produkten zugesetzt<sup>[42]</sup>. Interessant ist, daß **51** auch in Pflanzen entsteht<sup>[43]</sup>.

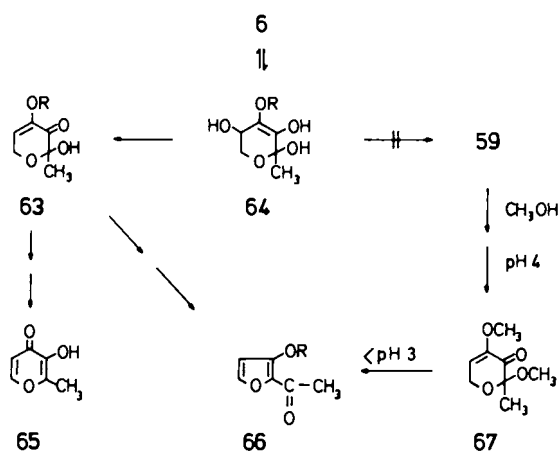
Weitere Folgeprodukte der 1-Desoxydiketosen erhält man über die cyclische Halbacetalform **6d**. Nach Enolisierung führt die Abspaltung der Hydroxygruppe am C2-Atom zum Pyranon **59**<sup>[44]</sup>. Diese Verbindung kann als universelle Indikatormaterialsubstanz zum Nachweis der Maillard-Reaktion herangezogen werden, da Hexosen in nahezu allen Lebensmitteln vorkommen. Verbindung **59** wird beim Erhitzen der Lebensmittel in ppm-Mengen gebildet und ist nach Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gaschromatographisch leicht nachweisbar<sup>[45]</sup>. Wird aus dem Halbacetal **6d** die Hydroxygruppe am C5-Atom abgespalten, entsteht das instabile Pyranon **58**, das sich unter anderem in den Milchsäureester **60** umlagert<sup>[23]</sup> (vgl. Abschnitt 2.6.1).

Die Tautomerisierung von **6d** führt zu einem  $\beta$ -Diketon, das in der cyclischen Halbacetalform **61** abgebildet ist. Diese Verbindung ist als Zwischenprodukt noch nicht nachgewiesen, man kann allerdings annehmen, daß sie leicht über eine  $\beta$ -Diketospaltung abgebaut wird, z. B. unter Bildung von 4-Aminoreduktonen<sup>[46]</sup> (vgl. Abschnitt 2.6.1). Das Acetylformoin **62**, das aus dem Keton **61** durch Eliminierung der  $\beta$ -ständigen Hydroxygruppe am C6-Atom der ursprünglichen Zuckerkette entsteht<sup>[26, 40]</sup>, geht leicht Folgereaktionen ein und wird daher, wenn überhaupt, meist nur in geringen Konzentrationen in Modellsystemen oder Lebensmitteln gefunden.

Der Abbau der 1-Desoxydiketone von Disacchariden unterscheidet sich zum Teil von dem der Monosaccharide. Dies



wird verständlich, wenn man von der cyclischen Form **64** ausgeht. Nach Enolisierung ist, ohne Spaltung der glycosidischen Bindung, nur die Eliminierung der Hydroxygruppe am C5-Atom unter Bildung des  $\beta$ -Pyranons **63** möglich. Das  $\gamma$ -Pyranon **59** ist demnach ein typisches Monosaccharid-Produkt, das nur über eine freie Hydroxygruppe am C4-Atom entstehen kann. Der Nachweis geringer Mengen des Pyranons **59** auch in Disaccharid-Umsetzungsgemischen läßt sich dadurch erklären, daß es während der Maillard-Reaktion in gewissem Umfang zur Spaltung der glycosidischen Bindung kommt (vgl. Abschnitt 2.5.1) und daß aus den dabei erhaltenen Monosacchariden auch **59** entsteht. Das  $\beta$ -Pyranon **63**, das bisher in erhitzter Milch ( $\text{R} = \beta\text{-Gal}$ )<sup>[47]</sup> und in gedämpften Ginsengwurzeln (roter Ginseng,  $\text{R} = \alpha\text{-Glu}$ )<sup>[48]</sup> nachgewiesen wurde, ist ein zentrales Zwischenprodukt beim Disaccharidabbau. Das weitere Schicksal von **63** hängt davon ab, welcher Zucker glycosidisch gebunden ist. Der  $\beta$ -Galactosylrest läßt die Bildung sowohl eines fünfgliedrigen als auch eines sechsgliedrigen Ringes zu. Überwiegend erhält man das  $\beta$ -Galactosylisomaltol **66** ( $\text{R} = \beta\text{-Gal}$ ), eine für die



Lactose charakteristische Maillard-Verbindung<sup>[49]</sup>. Die entsprechende Reaktionsfolge kann bei Monosacchariden beobachtet werden, wenn in alkoholischer Lösung erhitzt wird (im Formelbild Methanol). Aus dem  $\gamma$ -Pyranon **59** bildet sich zunächst bei pH 4 das  $\beta$ -Pyranon **67**, das sich nach weiterer Senkung des pH-Wertes zur Spaltung des Acetals in

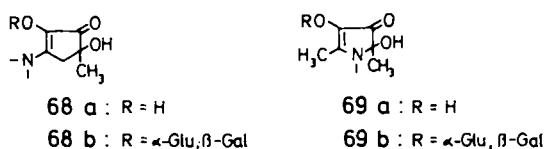


den Isomaltolmethylether **66** ( $R = \text{Methyl}$ ) umlagert<sup>[47]</sup>. Führt man diese Umsetzung in wäßriger Lösung durch, so findet man das dem Methylether entsprechende Isomaltol **66** ( $R = \text{H}$ ) nur in unbedeutenden Mengen<sup>[50]</sup>. Aus Maltose erhält man in größeren Mengen Maltol **65**<sup>[51]</sup> neben wenig  $\alpha$ -Glucosylisomaltol **66** ( $R = \alpha\text{-Glu}$ )<sup>[52]</sup>. Demnach kommt es bei **63** ( $R = \alpha\text{-Glu}$ ) in erheblichem Maße zur Spaltung der glycosidischen Bindung. Man kann dies auf die größere sterische Hinderung der Ringbeweglichkeit beim Maltosezwischenprodukt zurückführen, die auch durch Ringverengung und Bildung von **66** ( $R = \alpha\text{-Glu}$ ) nicht aufgehoben wird.

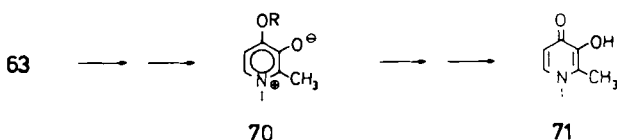
Wie bereits angedeutet, ist **62** sehr reaktiv. Wesentlich stabiler sind die Aminohexosereduktone **68a**, die in Gegenwart von sekundären Aminen aus **62** entstehen<sup>[53]</sup>. Unter optimalen Bedingungen kann man die Aminohexosereduktone in 30% Ausbeute (bezogen auf die verbrauchte Zuckermenge) erhalten. Dies zeigt indirekt die Bedeutung von **62** als Zwischenstufe bei der Maillard-Reaktion.

In Umsetzungsgemischen von Hexosen mit primären Aminen lassen sich die Pyrrolinone **69a** nachweisen. Man erhält diese Verbindungen aus **62** in sehr guten Ausbeuten<sup>[54]</sup>. Die stark fluoreszierenden Pyrrolinone **69a** wirken wie die Aminohexosereduktone antioxidativ (vgl. Abschnitt 3.4).

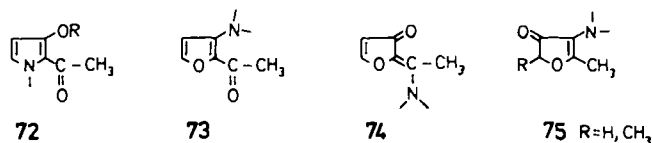
Bei der Reaktion von Disacchariden mit primären oder sekundären Aminen entstehen ebenfalls Aminoreduktone. Der Galactosyl- und der Glucosylrest bleibt in den Verbindungen **68b** bzw. **69b** glycosidisch gebunden, der Pyrrolinon- und der Cyclopentenongrundkörper sind identisch mit denen der Monosaccharidprodukte<sup>[55]</sup>.



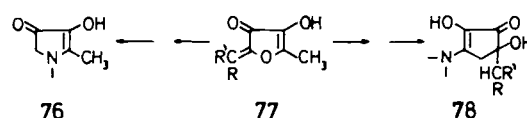
Das mit organischen Lösungsmitteln extrahierbare Hauptprodukt in Umsetzungsgemischen von Disacchariden und primären aliphatischen Aminen ist das Pyridon **71**<sup>[56]</sup>. Man kann davon ausgehen, daß aus **63** zunächst die Pyridiniumbetaine **70** ( $R = \alpha\text{-Glu}, \beta\text{-Gal}$ ) gebildet werden, die kürzlich als kristalline Verbindungen isoliert werden konnten<sup>[57]</sup>. Die Pyridiniumbetaine werden unter Spaltung der glycosidischen Bindung überwiegend zu **71** abgebaut. Von



Pyridonen dieses Strukturtyps ist bekannt, daß sie Metalle wie Eisen<sup>[58]</sup> und Aluminium<sup>[59]</sup> sehr fest binden; Versuche zur Beeinflussung der Spurenelementresorption und -ausscheidung werden zur Zeit durchgeführt. Als Nebenprodukt läßt sich das dem Galactosylisomaltol **66** ( $R = \beta\text{-Gal}$ ) entsprechende Pyrrolderivat **72** aus Lactoseumsetzungsgemischen abtrennen<sup>[47]</sup>. Beim Erhitzen von **66** mit primären und sekundären Aminen erhält man unter anderem die Furanderivate **73** und **74**<sup>[60]</sup>. N-haltige Folgeprodukte aus 1-Desoxydiketosen von Pentosen und 6-Desoxyhexosen sind die Verbindungen **75**<sup>[61]</sup> bzw. **76**. Das Pyrrolinon **76** ließ sich

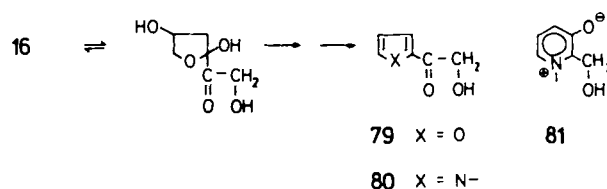


allerdings bisher nur in Umsetzungsgemischen von Kondensationsprodukten des Typs **77** mit primären Aminen erhalten. Mit sekundären Aminen bilden sich aus **77** unter Umlagerung die Verbindungen **78**, deren Strukturen denen der Aminohexosereduktone **68a** gleichen<sup>[62]</sup>.



### 2.5.3. Abbau der 4-Desoxydiketosen

Bisher ist in Maillard-Reaktionsgemischen der Nachweis der 4-Desoxydiketosen **16** noch nicht gelungen. Es sind aber Verbindungen isoliert worden, deren Bildung aus Zuckern sich am besten mit 4-Desoxydiketosen als Zwischenstufe erklären läßt. Hinweise erhält man aus den Strukturen der Verbindungen **79–81**. In Anwesenheit größerer Mengen pri-



märer Amine kann die Bildung des Hydroxyacetylfurans **79** stark zugunsten der beiden Stickstoffheterocyclen **80** und **81** zurückgedrängt sein<sup>[26, 27, 63]</sup>. 4-Desoxydiketosen entstehen, wie im Abschnitt 2.4.2 gezeigt, nicht aus den Aminoketosen des Typs **3**. Die Verbindungen **79–81** sind somit Indikatorsubstanzen dafür, daß der Abbau nicht ausschließlich über Aminoketosen verläuft<sup>[12b]</sup>.

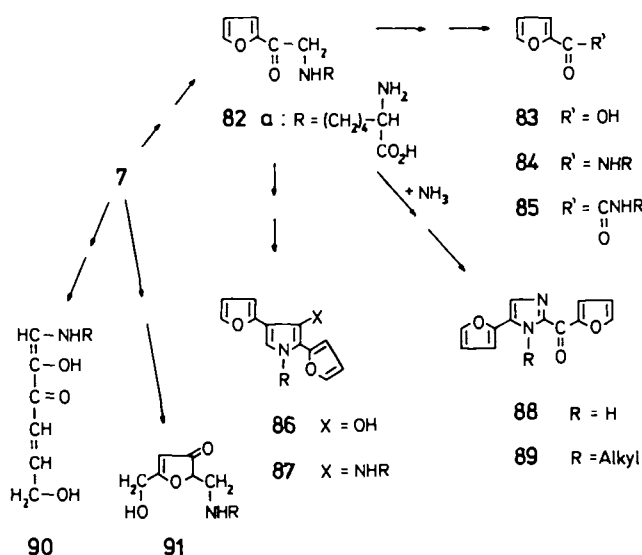
### 2.5.4. Abbau der 1-Amino-1,4-didesoxydiketosen

Der Nachweis der 1-Amino-1,4-didesoxydiketosen **7** als Umwandlungsprodukte der Aminoketosen ist erst kürzlich gelungen<sup>[12b, c]</sup>. Nach Cyclisierung und Wasserabspaltung erhält man Aminoacetylfurane **82**. Diese schon länger bekannten Substanzen entstehen beim Erhitzen von Amadori-Verbindungen in Gegenwart starker Säuren<sup>[64]</sup> (vgl. Abschnitt 4.3). Inzwischen ist nachgewiesen, daß **82** auch im pH-Bereich zwischen 4 und 7 gebildet wird. Dabei ist zu beachten, daß **82** im Säuren als stabiles Salz vorliegt, daß es

aber bei pH-Werten über 5 sehr schnell Folgereaktionen ein-  
geht.

Als Umwandlungs- und Kondensationsprodukte von **82** wurden unter anderem die Verbindungen **83–87** identifiziert<sup>[12c]</sup>. Aus den Strukturen der Furancarbonsäure **83**, des Furancarbonsäureamids **84** und des  $\alpha$ -Oxofuranacetamids **85** ist ersichtlich, daß das Aminoketon **82** leicht oxidiert wird. Bemerkenswert ist die Kondensation zum Aminopyrrol **87** (die Verbindungen **86** und **87** wurden nach Acetylierung des gesamten Umsetzungsgemisches als Monoacetate isoliert und identifiziert; in welchem Umfang die Verbindungen in der freien Form als Pyrrole vorliegen, ist noch nicht genauer untersucht). Überträgt man diese Cyclisierung auf Proteine, dann führt die Aminopyrrolbildung zur Quervernetzung von Proteinen, wenn zwei  $\epsilon$ -Aminogruppen von peptidgebundenen Lysinen beteiligt sind. Auf die Bedeutung von Quervernetzungsreaktionen in biologischem Material wird im Abschnitt 5.1 eingegangen.

Aus Aminoacetylfuranen des Typs **82** erhält man in Gegenwart von Ammoniak in guten Ausbeuten das Imidazol **88** und die Alkyllderivate **89**<sup>[65]</sup> (wenn von einer Alkylverbin-



dung ausgegangen wird). Verbindung **88** ist kürzlich als Indikatorsubstanz zum Nachweis der Quervernetzung von Proteinen beschrieben worden (vgl. Abschnitt 4.5). Dabei wird die Freisetzung von **88** aus einer quervernetzenden Vorstufe angenommen. Wie sich gezeigt hat<sup>[65]</sup>, bildet sich **88** während und nach der sauren Proteinhydrolyse aus Furosin **82a** und Ammoniak. **82a** entsteht dabei aus den Lysin-Amadori-Verbindungen **3a** oder **3c**, und Ammoniak wird z. B. aus Asparagin und Glutamin freigesetzt.

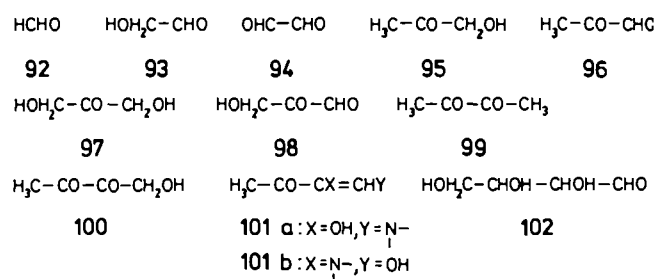
Kürzlich gelang die Isolierung und Identifizierung des Aminoreduktons **90** aus einem Glucose-Propylamin-Umsetzungsgemisch<sup>[37d]</sup>. Die 1-Propylamino-1,4-didesoxydiketose des allgemeinen Typs **7** kann hier als Zwischenstufe angenommen werden. Damit ist erstmals ein offenkettiges sechsgliedriges Aminoredukton in einem Maillard-Reaktionsgemisch nachgewiesen worden. Ausgehend von **7** läßt sich auch die Bildung des Furanons **91** formulieren. Allerdings wurde die Struktur **91** bisher nur massenspektrometrisch einem Peak im Gaschromatogramm eines silylierten Zucker-Amin-Reaktionsgemisches zugeordnet<sup>[66]</sup>.

## 2.6. Spaltreaktionen

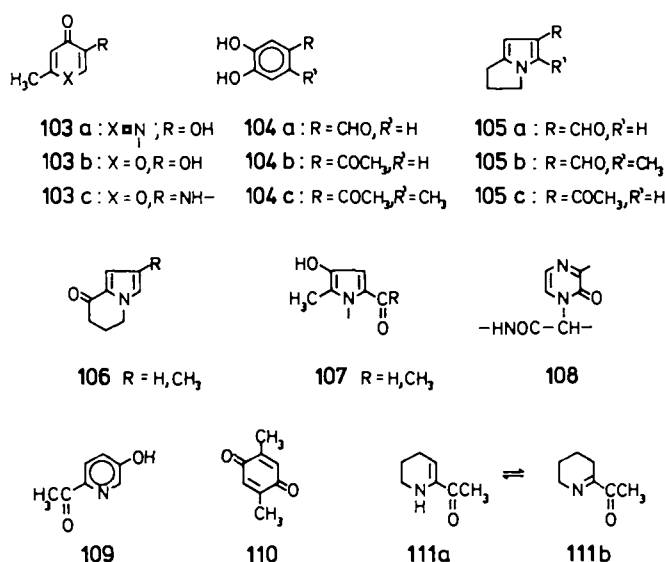
Mehrfach wurde bereits darauf hingewiesen, daß es im Verlauf der Zuckerumwandlung zur Spaltung der Kohlenstoffkette kommen kann. Die Spaltprodukte sind, wie noch gezeigt wird, zum Teil sehr reaktive Verbindungen, die wesentlich zur Beschleunigung der Maillard-Reaktion beitragen<sup>[67]</sup>. Eine beträchtliche Bedeutung haben Zuckerfragmente bei der Aromabildung (vgl. Abschnitt 3.1).

### 2.6.1. Retroaldolreaktionen

Beim Zucker und bei vielen Zwischenprodukten sind Retroaldolreaktionen möglich. Von den Verbindungen **92–102**<sup>[46a, 68]</sup> kann angenommen werden, daß sie über eine

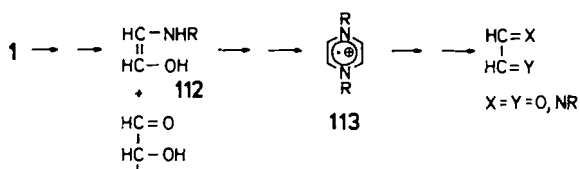


Aldolspaltung entstehen. Oxidation und/oder Dehydratisierung schließen sich in einigen Fällen an. Die Spaltprodukte sind teilweise sehr reaktiv, sie gehen leicht Kondensationsreaktionen ein. Als Partner stehen weitere Retroaldolverbindungen sowie Zuckerabbauprodukte mit intaktem Kohlenstoffgerüst zur Verfügung. Die Kondensationsprodukte **103–111** sollen einen Eindruck vermitteln, welche Struktu-



ren dabei gebildet werden<sup>[69, 37c]</sup>. Weitere Untersuchungen lassen erkennen, daß der Fortgang des Zuckerabbaus mit der Bildung der Spaltprodukte übereinstimmt. In der Anfangsphase überwiegen C<sub>2</sub>-Fragmente, die aus dem Zucker oder dem Imin **1** gebildet werden. Voraussetzung dafür ist aller-

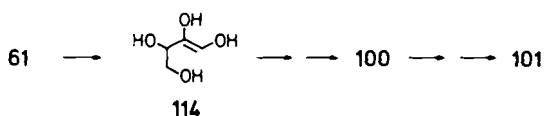
dings, daß von einer Aldose ausgegangen wird. Elektronenspinresonanz-Messungen geben Hinweise, daß aus dem Iminspaltprodukt **112** unter anderem das Pyrazin-Radikalkation **113** entsteht, aus dem nach Oxidation Glyoxal und N-Analoga frei werden, die sofort Folgereaktionen eingehen<sup>[70]</sup>.



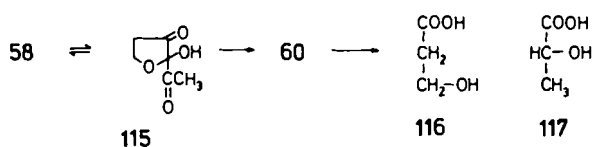
C<sub>3</sub>-Fragmente findet man etwas später, wenn bereits Ketosen oder Amadori-Produkte vorliegen. Die Menge der Spaltprodukte ist vom pH-Wert der Reaktionslösung bzw. des Lebensmittels abhängig. Im pH-Bereich < 7 spielen Substanzen aus der Retroaldolreaktion eine eher untergeordnete Rolle<sup>[67, 71]</sup>. Zu beachten ist aber, daß auch von sehr geringen Mengen eines daraus entstandenen Aromastoffs eine große Wirkung ausgehen kann, wenn der Geruchsschwellenwert sehr niedrig ist.

Geht man davon aus, daß die Bräunungsgeschwindigkeit mit der Menge der gebildeten C<sub>2</sub>- und C<sub>3</sub>-Fragmente zusammenhängt, dann wird verständlich, daß sich Disaccharid-Reaktionslösungen langsamer verfärben. Zumindest die C<sub>3</sub>-Produkte können sich über eine Retroaldolreaktion erst nach Hydrolyse der glycosidischen Bindung bilden<sup>[72]</sup>. Möglicherweise hat auch die unterschiedliche sterische Anordnung der Hydroxygruppe am C4-Atom bei Glucose und Galactose einen Einfluß auf die Spaltungs- bzw. Bräunungsgeschwindigkeit<sup>[73]</sup>.

Aus Markierungsversuchen läßt sich ableiten, daß die C<sub>4</sub>-Aminoreduktone **101** über das β-Diketon **61** entstehen. Weder das C1- noch das C6-Atom des Zuckers sind identisch mit dem Methyl-C-Atom des C<sub>4</sub>-Produkts **101**<sup>[46]</sup>. Nach Spaltung von **61** zur Tetrose (in der enolisierten Form **114** gezeichnet) führt die 1-Desoxyform **100** unter Amineinbau

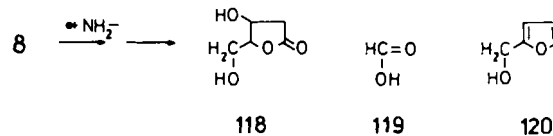


zum Produkt **101**. Zur Bildung der Säuren **116** und **117** trägt ebenfalls die Retroaldolreaktion bei. Das instabile β-Pyranon **58** steht im Gleichgewicht mit dem Furanon **115**. Nach β-Spaltung erhält man daraus den Ester **60**, der je nach Umsetzungsbedingungen mehr oder weniger schnell in β-Hydroxypropionsäure **116** und Milchsäure **117** gespalten wird<sup>[23]</sup>.

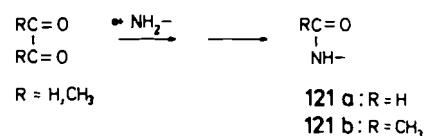


## 2.6.2. α-Diketospaltungen

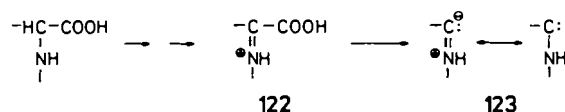
Erhitzt man die 3-Desoxyaldoketose **8** unter Maillard-Bedingungen (d. h. in wäßriger neutraler Lösung in Gegenwart von Aminen) und unter Ausschluß von Sauerstoff, dann lassen sich unter anderem das Lacton **118**, Ameisensäure **119** und der Furfurylalkohol **120** mit organischen Lösungsmit-



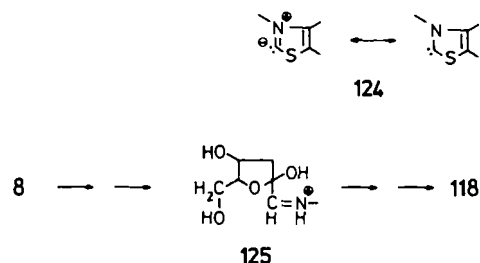
teln extrahieren<sup>[74]</sup>. Modellversuche mit Glyoxal und Methylglyoxal führten bereits früher zum Nachweis der Säureamide **121 a** und **121 b**<sup>[75]</sup>. Zur Bildung von **118**–**121** muß die α-Diketogruppe gespalten werden. Spaltungen dieses Typs sind bekannt, allerdings lassen sich kaum Vorschläge für den Verlauf solcher Reaktionen finden.



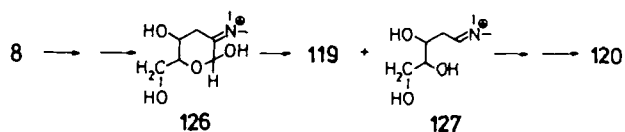
Bei der Decarboxylierung der α-Ammoniumcarbonsäuren **122** wird ein Betain des Typs **123** als Zwischenprodukt angegeben<sup>[76]</sup>, das eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Thiazolium-



betain **124** von Thiamin hat. Nimmt man an, daß sich bei der Spaltung der Desoxyaldoketose **8** zunächst **125** bildet, dann sind neben **118** C<sub>1</sub>-Ammoniumbetaine zu erwarten. Deren Nachweis oder die Identifizierung von Folgeprodukten ist jedoch bisher nicht gelungen. Alternativ könnte man aus der

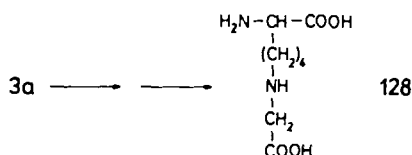


Zwischenstufe **126** Ameisensäure **119** und das C<sub>5</sub>-Fragment **127** ableiten, wobei letzteres zum Furfurylalkohol **120** weiterreagieren könnte. Das Lacton **118** und auch Ameisensäure findet man in wesentlich größerem Umfang in Gegenwart von Sauerstoff, die Menge des Furfurylalkohols **120** nimmt



dagegen nicht zu. Man kann daher annehmen, daß **118** und **119** in Umsetzungsgemischen überwiegend durch oxidativen Abbau von **8** entstehen.

Kürzlich gelang im Proteinhydrolysat von biologischem Material (vgl. Abschnitt 4.5) die Identifizierung des Lysinderivats **128**<sup>[77]</sup>. Nach den bisherigen experimentellen Ergeb-

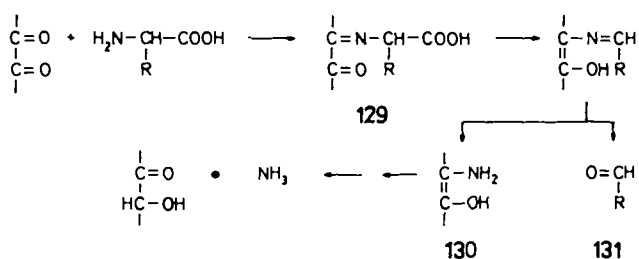


nissen bildet sich **128** durch oxidative Spaltung der entsprechenden Aminoketose **3a**<sup>[78]</sup>.

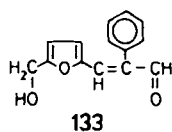
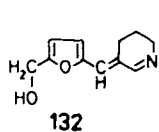
## 2.7. Der Strecker-Abbau

### 2.7.1. Strecker-Abbau von Aminosäuren

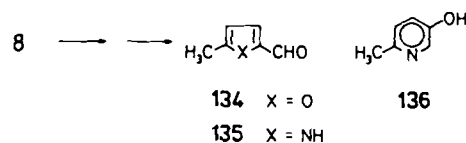
Die Decarboxylierung von Aminosäuren beim Erhitzen mit Zuckern ist schon länger bekannt. Ausgelöst wird sie durch die Reaktion der Aminosäuren mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen<sup>[79]</sup>. Aus der zunächst gebildeten azavinylogenen  $\beta$ -Ketosäure **129** wird Kohlendioxid abgespalten. Die Bedeutung des Strecker-Abbaus liegt darin, daß aus den Aminosäuren Ammoniak und die reaktive Aldehyde des Typs **131** entstehen, Verbindungen, die unter anderem an



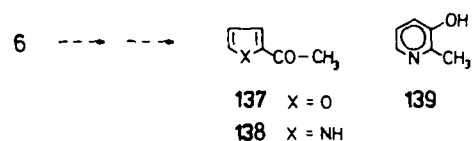
Kondensationsreaktionen beteiligt sind. So findet man in Lysin- und Phenylalanin-Umsetzungsgemischen mit Hexosen die Furane **132**<sup>[80]</sup> und **133**<sup>[81]</sup>, in deren Strukturen der jeweilige Streckeraldehyd zu finden ist. Ammoniak in der freien Form oder als Aminoenol **130** ist an der Bildung von Pyridinen, Pyrazinen, Imidazolen etc. beteiligt<sup>[82]</sup>.



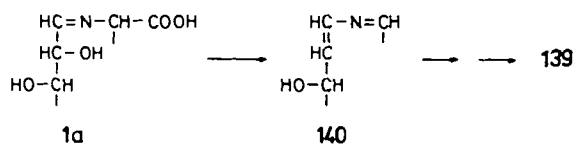
Durch den Strecker-Abbau der Aminosäuren werden die Desoxyaldoketosen und -diketosen reduziert. Nach Cyclisierung und Wasserabspaltung erhält man aus **8** das Furan **134** und unter Ammoniakbeteiligung das Pyrrol **135** und das Pyridin **136**<sup>[83]</sup>. Aus 1-Desoxydiketosen wie **6** lassen sich



unter anderem die Verbindungen **137–139** ableiten. Allerdings ist bei diesen Substanzen das Kohlenstoffatom der Methylgruppe nicht mit dem C1-Atom der umgesetzten Hexose identisch. Als Weg zu **138** und **139** wird daher ein Abbau

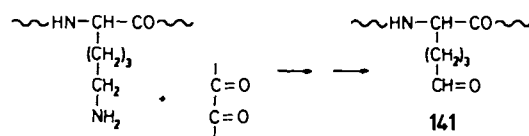


über das Imin **1a** vorgeschlagen<sup>[84]</sup>. Die Wasserabspaltung aus **1a** führt zunächst zur 2-Desoxyhexose **140**, die nach Hydrolyse der Iminfunktion zum Pyrrol **138** oder zum Pyridin **139** weiterreagiert. Auf den Strecker-Abbau von Prolin und Hydroxyprolin wird in Abschnitt 2.8.2 näher eingegangen. Eine weitere Reaktionsfolge, die zur Reduktion von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen führt, wird in Abschnitt 3.4 vorgestellt.



### 2.7.2. Strecker-Abbau von Aminen

In vielen Lebensmitteln und vor allem in vivo ist die Lysinseitenkette das wichtigste Amin für die Maillard-Reaktion. Es stellt sich die Frage, ob Lysin in Gegenwart von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen das Formylprodukt **141** liefert. Im Protein sind dann ähnliche Reaktionen zu erwarten wie jene, die beim Aufbau des Collagens zur Quervernetzung führen. Be-



kannt ist, daß primäre aliphatische Amine in Gegenwart von  $\alpha,\beta$ -Triketonen wie Ninhydrin oder Dehydroascorbinsäure in die entsprechenden Aldehyde umgewandelt werden<sup>[85]</sup>.

Bei der Maillard-Reaktion entstehen zwar auch Triketone, z. B. das  $\beta$ -Pyranon **58** oder oxidierte Reduktone, weitaus größere Bedeutung haben aber  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen. Die bisher vorliegenden Untersuchungsergebnisse liefern keine eindeutigen Hinweise darauf, daß diese Verbindungen bei der Maillard-Reaktion zu einer Spaltung von primären aliphatischen Aminen unter Bildung von Ammoniak und Aldehyden führen.

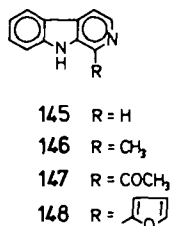
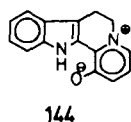
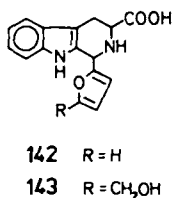
## 2.8. Einfluß spezieller Aminosäuren und Amine auf die Produktbildung

In diesem Abschnitt werden einige Reaktionen zusammengefaßt, die, bedingt durch strukturelle Besonderheiten bei den Aminkomponenten, zu speziellen Produkten führen.

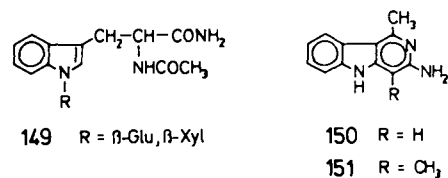
### 2.8.1. Tryptophan

Ein besonders im Hinblick auf die Maillard-Reaktion in vivo wichtiger Befund ist, daß proteingebundenes Tryptophan mit reduzierenden Zuckern nur in geringem Umfang reagiert<sup>[86]</sup>. Die essentielle Aminosäure Tryptophan wird demnach in Gegensatz zum essentiellen Lysin bei Protein-Zucker-Reaktionen kaum geschädigt. In Lebensmitteln kann Tryptophan auch in freier Form vorkommen (z. B. Sojasauce). Dann ist bereits unter milden Bedingungen mit reaktiven Carbonylverbindungen der Ringschluß unter Bildung von  $\beta$ -Carbolinen möglich. Die Derivate **142** und **143** wurden in Sojasauce nachgewiesen<sup>[87]</sup> (vgl. Abschnitt 3.5).

Unter drastischen Umsetzungsbedingungen erhält man noch weitere  $\beta$ -Carboline, die zum Teil auch in Lebensmitteln gefunden werden<sup>[88]</sup>. Wie aus den Strukturen **144–148** zu erkennen ist, laufen dabei neben der Cyclisierung noch Decarboxylierungs- und Dehydrierungsreaktionen ab. An der Bildung von **144** und **148** dürften 3-Desoxyaldoketosen

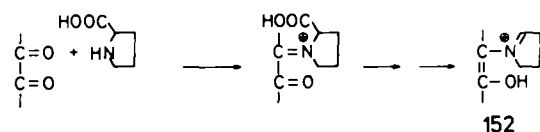


beteiligt sein (die Verbindungen wurden aus Pentose-Tryptophan-Umsetzungsgemischen isoliert). Wenn die  $\alpha$ -Aminogruppe des Tryptophans blockiert ist, bilden sich Glycosylderivate **149** (R =  $\beta$ -Glu,  $\beta$ -Xyl). Folgereaktionen wie eine Amadori-Umlagerung zu den entsprechenden Aminoketosenen konnten bisher nicht nachgewiesen werden<sup>[89]</sup>. In welchem Umfang bei der Maillard-Reaktion Verbindungen des Typs **149** entstehen, ist noch nicht untersucht. Größere Beachtung finden die Tryptophanderivate **150** und **151** wegen ihrer stark mutagenen und cancerogenen Wirkung<sup>[90]</sup>. Die zunächst in Pyrolysaten von Tryptophan und von tryptophanhaltigen Proteinen nachgewiesenen Substanzen wurden inzwischen auch in thermisch stärker belasteten Lebensmitteln gefunden<sup>[91]</sup>.

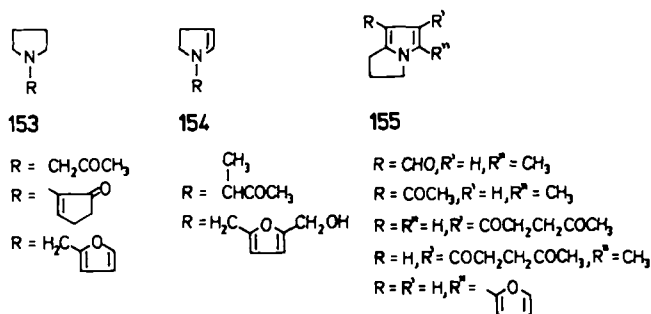


### 2.8.2. Prolin und Hydroxyprolin

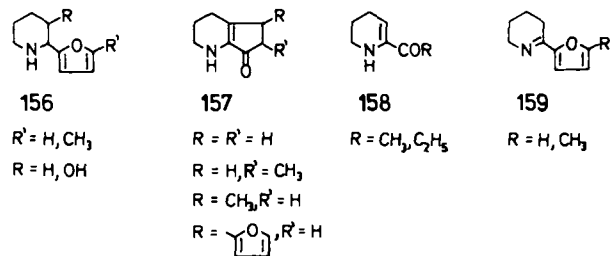
Prolin kommt in größerer Menge in Getreideprodukten wie Malz vor. Sehr gut untersucht ist die Beteiligung dieser Aminosäure bei der Bildung flüchtiger Aromastoffe im Malz. Man nimmt an, daß die Dihydropyrrolyliumverbindung **152**, ein Zwischenprodukt bei der Reaktion von Prolin mit  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen, dabei eine zentrale Rolle spielt. Von **152** führen Folgereaktionen zu Stickstoffheterocyclen.



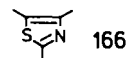
Aus den Strukturen der Verbindungen **31** und **153–162** läßt sich ableiten, daß die Stabilisierung des Zwischenprodukts **152** durch Elektronenaufnahme (**153**), Protonenabspaltung (**154**), Addition von Heteroatomen (**31**) oder Addition von anderen Nucleophilen (**155**) erreicht wird<sup>[92]</sup>. Die



Öffnung des Dihydropyrrolyliumrings führt nach intra- oder intermolekularer Kondensation auch zum erneuten Ringschluß unter Bildung der Pyridinderivate **156–159**<sup>[93]</sup> sowie

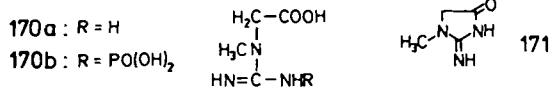


des Dihydroindolizins **160** und der teilhydrierten Cyclopentazepinone **161** und **162**<sup>[94]</sup>. Zur Bildung des Malzoxazins **31** wird ein Reaktionsweg ausgehend von **8** via **152** vorgeschlagen.

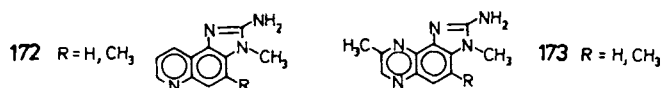


163 164
  
 $R = CH_2COCH_3,$ 
  
 $CH_2COCH_2CH_2COCH_3,$ 
  
  
 165 (R' = H, CH\_2, CH\_2OH)

*Angew. Chem.* 102 (1990) 597–626



Verbindungen 172 und 173 beteiligt. Beide wurden in hoch erhitzten Röstgemischen von Aminosäuren und Kreatin mit<sup>[104]</sup> und ohne Hexosen<sup>[105]</sup> nachgewiesen, später auch in Fleisch- und Fischprodukten<sup>[106]</sup>.

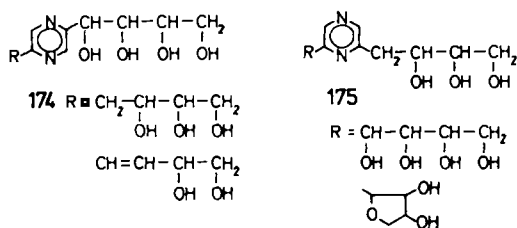


Man kann davon ausgehen, daß Kreatinin als methylenaktive Verbindung mit Aldehyden (z. B. aus dem Strecker-Abbau der Aminosäuren) kondensiert und daß sich weitere Reaktionen mit Zuckerabbauprodukten und Ammoniak anschließen. Zumindest läßt sich die Konzentration an 172 und 173 deutlich senken, wenn die Strecker-Aldehyde mit Tryptophan abgefangen werden<sup>[107]</sup>. Allerdings ist dieses Verfahren in der Regel nicht auf Lebensmittel übertragbar, da Tryptophan selbst die Bildung von cancerogenen und mutagenen Maillard-Produkten verursachen kann (vgl. Abschnitt 2.8.1).

Es hat sich inzwischen gezeigt, daß die Menge der gebildeten cancerogenen Verbindungen überwiegend von den Bedingungen bei der Verarbeitung der Lebensmittel abhängt und daß durch eine schonendere Prozeßführung ihre Bildung weitgehend verhindert werden kann. Wenn z. B. über 130 °C erhitzt wird, findet man in Lebensmitteln Konzentrationen im unteren ppb-Bereich; unter Kochbedingungen bleibt die Menge an 172 und 173 meist jenseits der Nachweisgrenze.

## 2.8.6. Ammoniak

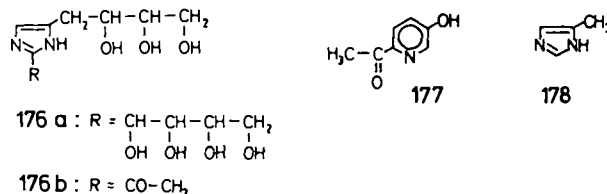
Ammoniak kommt in unverdorbenen Lebensmitteln in der Regel nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Zur Herstellung von Zuckercouleur zum Färben von Lebensmitteln (z. B. Cola-Getränke) wird Ammoniak in großen Mengen mit Zuckern umgesetzt. Mit Ammoniak ist die Bildung von Pyridinen<sup>[108]</sup>, Pyrazinen<sup>[109]</sup>, und Imidazolen<sup>[110]</sup> möglich, ohne daß eine C-N-Bindung gespalten werden muß. Demgemäß findet man in Zucker-Ammoniak-Reaktionsgemischen in großem Umfang diese Heterocyclen. Die Verbindungen 174 bis 177 sind als Beispiele angegeben. Über



diese Substanzen kann der Zusatz von Ammoniakcouleuren nachgewiesen werden<sup>[8a, 111]</sup>. Nötig ist dies bei Bier, Broten und anderen Lebensmitteln, bei denen durch die

dunklere Färbung die Verwendung bestimmter Rohstoffe vorgetauscht werden soll<sup>[112]</sup>.

Verbindung 176b vermindert bei Ratten reversibel die Anzahl der Lymphozyten<sup>[110a]</sup>, wenn eine Vitamin-B6-arme Diät verfüttert wird. Das 4-Methylimidazol 178 ist toxisch<sup>[113]</sup>. Für beide Substanzen sind Höchstmengen in Ammoniakcouleuren festgesetzt<sup>[114]</sup>. Polyhydroxyalkylpyrazine bilden sich aus Aminosackern<sup>[115]</sup> (z. B. 2-Aminoglucose), doch deren Vorkommen in Lebensmitteln ist, wie bereits in Abschnitt 2.5.1 erwähnt, unbedeutend.



## 2.9. Hochmolekulare Verbindungen (Melanoidine)

Trennt man Reaktionsgemische von Zuckern und Aminen durch Ausschlußchromatographie, so erhält man auch Fraktionen mit Molekulargewichten von ca. 7000 und darüber. Bisher ist es noch nicht gelungen, einheitliche höhermolekulare Maillard-Produkte zu isolieren<sup>[116]</sup>. Über die Strukturen der hochmolekularen Substanzen, der Melanoidine, ist sehr wenig bekannt. Informationen hierüber stammen im wesentlichen aus der Interpretation von Spektren. Die <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektren der in mehreren Arbeitsgruppen isolierten Melanoidine unterscheiden sich zum Teil beträchtlich. Es gibt Melanoidine mit Signalgruppen, die denen von Amadori-Produkten sehr ähnlich sind<sup>[117]</sup>, und solche, die im Olefin-, Aren- und Carbonylbereich weitere Signale aufweisen<sup>[118]</sup>. Aus Untersuchungen mit <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N-markierten Zuckern und Aminosäuren geht hervor, daß die Carboxygruppe der Aminosäure zum Teil unverändert im Melanoidin enthalten ist und daß das Signal des α-C-Atoms überwiegend an der Stelle im Melanoidin-Spektrum zu finden ist, an der es auch im Aminosäurespektrum auftritt. Abweichend davon tauchen im <sup>15</sup>N-NMR-Spektrum auch Signale im Pyrrol-, Indol- und Amidbereich auf<sup>[118]</sup>. Signale für das C1-Atom des Zuckers findet man im gesamten Spektralbereich, was in Übereinstimmung mit der Bildung der verschiedenen Desoxyaldoketosen und -diketosen sowie den Strukturen der Folgeprodukte ist. Aus den Strukturen der Spaltprodukte, die nach Ozon- oder Wasserstoffperoxideinwirkung<sup>[119]</sup> auf die Melanoidine erhalten werden, ergaben sich keine brauchbaren Rückschlüsse auf die Monomere, die zu höhermolekularen Maillard-Produkten reagieren. Pyrolytische Spaltungen der Melanoidine mit anschließender gaschromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Erfassung der flüchtigen Komponenten führten bisher ebenfalls noch nicht zu eindeutigen Ergebnissen<sup>[120]</sup>. Bei der Untersuchung von Zuckercouleur konnte durch Curie-Punktpyrolyse zwischen den unterschiedlich hergestellten Produkten differenziert werden<sup>[121]</sup>. Auf die Elektronenspinresonanzmessungen mit Melanoidinen soll nur hingewiesen werden; über die Strukturen von Radikalen konnten noch keine genauen Angaben gemacht

werden<sup>[122]</sup>. Aus dem Absorptionsverhalten von Melanoidinen im UV/VIS-Bereich läßt sich erkennen, daß Kondensationsreaktionen nur in geringem Maße an der Verknüpfung von Monomeren beteiligt sind<sup>[123]</sup>. Möglicherweise spielen Substitutionsreaktionen, die auch bei der Quervernetzung von Proteinen diskutiert werden, eine Rolle.

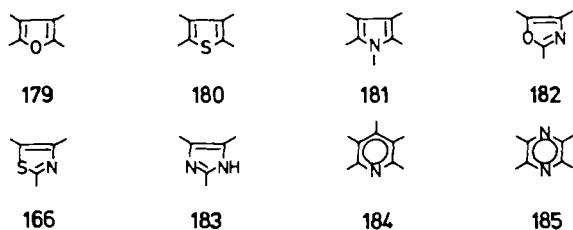
### 3. Bedeutung der Maillard-Reaktion für Lebensmittel

Mit der Einführung des Feuers als Hilfsmittel bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln hat die Maillard-Reaktion vor einigen hunderttausend Jahren Einzug in die Lebensmittelchemie gehalten. Unter anderem dient sie zur Verfeinerung des sensorischen Erscheinungsbildes vieler Speisen. Wer kennt nicht den typischen Geruch von einer warmen Brotkruste, einem Braten oder von frischgemahlenen, gerösteten Kaffeebohnen? Die braunen Farbtöne der verschiedenen Biere sind ebenso Ergebnisse der Maillard-Reaktion wie der Geschmack einer Bratenkruste. Seit einigen Jahren ist allerdings nachgewiesen, daß die Maillard-Reaktion auch an der Bildung mutagener und cancerogener Verbindungen beteiligt ist und Nährwertminderungen verursachen kann.

#### 3.1. Geruch

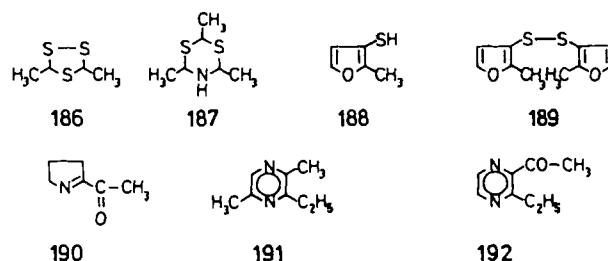
Das große Interesse der Lebensmittelindustrie an der Maillard-Reaktion ergibt sich überwiegend aus dem Wunsch, charakteristische Koch-, Back-, Brat- und Röstaromen herstellen zu können. Seit der Einführung der Kombination Gaschromatographie-Massenspektrometrie als Analysesystem zur Trennung und Identifizierung von leichtflüchtigen Verbindungen setzte eine intensive Suche nach geruchsspezifischen Substanzen ein. In einer Reihe von Übersichtsartikeln sind die Ergebnisse zusammengefaßt<sup>[17], [24]</sup>. An dieser Stelle sollen deshalb nur einige Aspekte besprochen werden.

Aus verschiedenen behandelten Lebensmitteln (gekocht, geröstet, gebraten usw.) sind jeweils hunderte von flüchtigen Verbindungen abgetrennt und identifiziert worden. Die Strukturen der Verbindungen 166 und 179–185 sollen einen



Eindruck von der Vielfalt der gefundenen Heterocyclen vermitteln. Dazu kommen noch viele der in Abschnitt 2.5.2 aufgeführten Komponenten, wenn Prolin als Ausgangssubstanz im Lebensmittel vorliegt, und alle weiteren leichtflüchtigen Maillard-Produkte, die als Ester, Säuren, Ketone, Aldehyde, Alkohole, Alkene, Alkane, Arene, Amine, Mercaptane usw. einen mehr oder weniger großen positiven oder negativen Beitrag zum Aromaeindruck leisten.

Die Hoffnungen haben sich bisher nicht erfüllt, daß die Aromen von gekochtem oder gegrilltem Fleisch, geröstetem Kaffee und Kakao, von Brot oder Karamelprodukten mit jeweils nur einer Substanz befriedigend wiedergegeben werden können. Dazu sind in der Regel mehrere Verbindungen nötig, die zudem in einem ausgewogenen Mengenverhältnis vorliegen müssen. Über Aromagramme läßt sich der Beitrag der einzelnen Komponenten am Gesamteindruck abschätzen. Aromagramme erhält man, indem man die weitgehend getrennten, flüchtigen Substanzen eines komplexen Gemisches nach Austritt aus der GC-Säule mit der Nase detektiert. Ausschlaggebend für die Erfassung der Verbindungen ist dabei, ob die Konzentrationen, in denen sie im Gemisch vorliegen, über ihrem jeweiligen Geruchsschwellenwert liegen. Durch schrittweise Verdünnung des Substanzgemisches (jeweils Verdoppelung des Lösungsmittelanteils) bleiben in der Regel nur einige für die Nase wahrnehmbare Verbindungen übrig. Meist tragen diese Substanzen wesentlich zum Aroma des Produktes bei. Aus dem Aromagramm läßt sich z. B. erkennen, daß nicht so sehr das Trithiolan 186 und das Dithiazinan 187, wie früher vermutet<sup>[125]</sup>, sondern das Mercaptofuran 188 und sein Oxidationsprodukt 189 für das Aroma von gekochtem Fleisch wichtig sind<sup>[126]</sup>. Einen bedeutenden Beitrag zum Weißbrotaroma leistet unter anderem das Acetylpyrrolin 190<sup>[127]</sup>, und der typische Geruch von gerösteten Nüssen wird durch die Pyrazine 191 und 192 mitbestimmt<sup>[128]</sup>. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die



Konzentration des Acetylpyrrolins 190 wesentlich von der Menge der C<sub>3</sub>-Produkte im Brot abhängt. Speziell beim Weißbrot ist neben der Maillard-Reaktion die Hefe ein wichtiger Produzent für diese Ausgangsverbindungen (z. B. Dihydroxyacetonmonophosphat)<sup>[129]</sup>. Da durch die Art der Verarbeitung die Mengen der aromaintensiven Verbindungen in Lebensmitteln stark variieren können, ist es für die Lebensmittelüberwachung schwierig, Richtwerte festzusetzen. Der Zusatz von Aromasubstanzen, die über die Maillard-Reaktion gebildet werden, läßt sich demnach kaum nachweisen.

#### 3.2. Geschmack

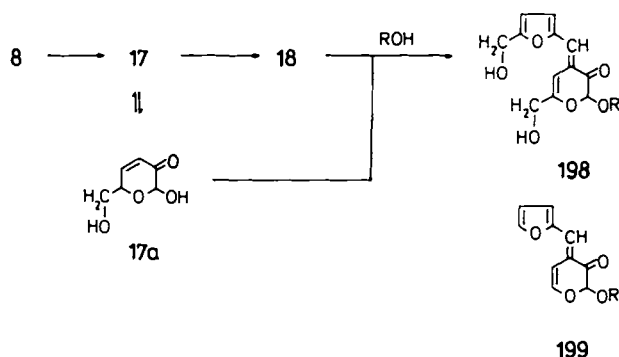
Kommt es beim Backen oder Braten von Brot bzw. Fleisch an der Oberfläche zu einer Überhitzung, dann schmeckt die Kruste in der Regel bitter. Derselbe Effekt tritt auf, wenn Bierwürze bei höheren Temperaturen gekocht wird. Auch Modellmischungen aus Zuckern und Aminosäuren schmecken bitter, wenn sie unter Röstbedingungen erhitzt werden. Die stärkste Bitternote läßt sich dabei mit Prolin erzie-



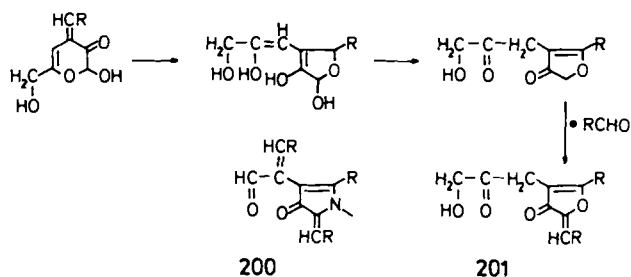
**193** R = OH, R' = CH<sub>3</sub>  
**194** R = H, R' = CH<sub>3</sub>  
**195** R = R' = H  
**196** R = H  
**197** R = CH<sub>3</sub>

### 3.3. Farbe

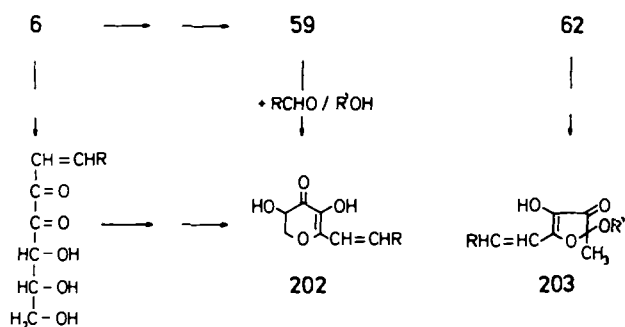
Farbige Maillard-Produkte wurden bisher ausschließlich aus Modellsystemen isoliert und identifiziert. Die Strukturen von Substanzen, bei denen das Kohlenstoffgerüst der Zucker erhalten geblieben ist, lassen erkennen, daß Desoxyaldoketoson- und -diketoson wichtige Zwischenprodukte sind. So ist die gelbe Verbindung **198** aus der Kondensation des Hydroxymethylfurfurals **18** mit dem Pyranon **17a** hervorgegan-



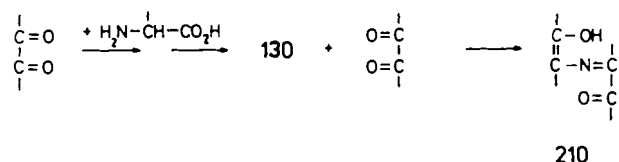
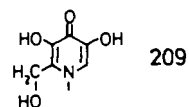
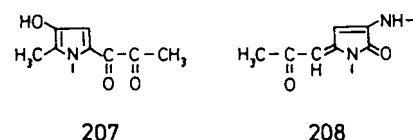
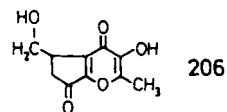
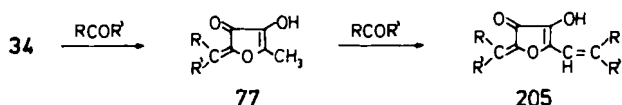
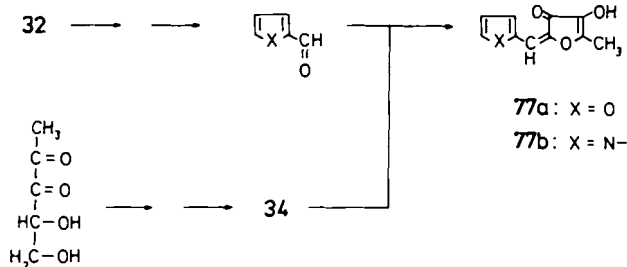
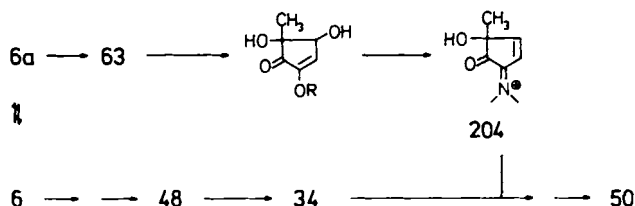
Bemerkenswert ist, daß beim Erhitzen von Furfural in Gegenwart eines primären Amins das rote Pyrrolinon **200** erhalten wird, dessen Struktur der des Furanons **201** sehr ähnlich ist<sup>[134]</sup>. Es läßt sich errahnen, welches Kondensationspotential in den 3-Desoxyaldoketosen, den Vorstufen bei der Bildung dieser farbigen Substanzen, steckt. In Lebensmitteln können sie mit einer ganzen Reihe von Carbonylverbindungen kondensieren, so daß sich eine Vielzahl von Bräunungsprodukten ergibt, ganz davon abgesehen, daß weder **200** noch **201** bereits stabile Endprodukte sind. Damit wird auch verständlich, warum die Isolierung von farbigen Maillard-Produkten aus erhitzten Lebensmitteln bisher noch nicht gelungen ist.



1-Desoxydiketosene reagieren ebenfalls zu farbigen Substanzen. Aus Amadori-Verbindungen erhält man mit einer Carbonylkomponente unter anderem die gelben Verbindungen **202** und **203**<sup>[135]</sup>, die als Bestandteile die 1-Desoxydike-

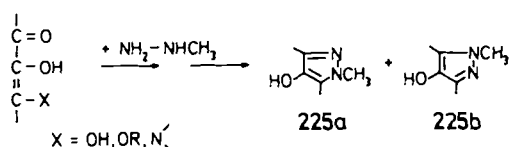


*Angew. Chem.* 102 (1990) 597–626





tion nach säulenchromatographischer Trennung<sup>[148]</sup> oder die Kondensation mit Hydrazinen zu Hydroxypyrazolen des Typs **225** an, die nach Derivatisierung gaschromatographisch nachweisbar sind<sup>[149]</sup>. Carbocyclische Reduktone lassen sich nicht in Hydroxypyrazole überführen. Nach Umsetzung mit Methanol/Toluolsulfonsäure erhält man flüchtige Methoxyderivate<sup>[141]</sup>.

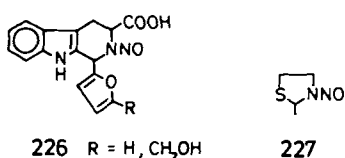


Es gibt zwar Hinweise darauf, daß bestimmte Melanoidine antioxidativ wirken<sup>[150]</sup>, doch für die Annahme, daß die Wirkung von Reduktionstrukturen ausgeht, fehlt die experimentelle Bestätigung.

### 3.5. Mutagene Substanzen

Seit der Einführung des Ames-Tests zum Nachweis mutagener Verbindungen wurden etliche Umsetzungsgemische, Fraktionen und Maillard-Produkte untersucht. Die Ergebnisse aus Untersuchungen von Lebensmitteln<sup>[151]</sup>, Aromakonzentraten<sup>[152]</sup>, Modellsystemen<sup>[153]</sup> und daraus gewonnenen Fraktionen lassen sich meist nicht vergleichen und sind zum Teil widersprüchlich. Die Aufmerksamkeit richtet sich zur Zeit auf die Maillard-Produkte **172** und **173**, deren cancerogene Wirkung inzwischen sehr gut belegt ist<sup>[154]</sup>. Probleme bereitet noch der schnelle und sichere Nachweis dieser Verbindungen, die in einigen Lebensmitteln im ppb-Bereich und darunter vorkommen. Im Abschnitt 2.8.5 wurde bereits auf Maßnahmen zur weitgehenden Unterbindung ihrer Bildung hingewiesen. Eine gewisse Bedeutung in Lebensmitteln haben auch die mutagenen und cancerogenen Tryptophanprodukte **150** und **151**<sup>[91]</sup>. Mischungen dieser Verbindungen mit Melanoidinen, die aus Reaktionsgemischen von Glucose und Glycin abgetrennt wurden, zeigen deutlich gehemmte Mutationsraten im Ames-Test<sup>[155]</sup>. Welchen Wert solche Ergebnisse für die Praxis haben, läßt sich noch nicht beurteilen.

Schon länger bekannt ist die mutagene und zum Teil stark cancerogene Wirkung der Nitrosamine. In Lebensmitteln können sekundäre Amine während der Herstellung, Verarbeitung und Zubereitung mit zugesetztem Nitrit oder auch im Magen mit Nitrit aus der Speichelflüssigkeit zu Nitrosaminen reagieren. Im Verlauf der Maillard-Reaktion entstehen sekundäre Amine (z. B. Amadori-Verbindungen). Nach Zugabe von Nitrit findet man bei Amadori- und Heyns-Produkten, abgesehen von der Tryptophanverbindung<sup>[156a]</sup>, keine<sup>[156b]</sup>, bei den Tryptophanderivaten des Typs **226** (Strukturvorschlag)<sup>[157]</sup> und Nitrosothiazolidinen



der Struktur **227** dagegen eindeutig mutagene Wirkung<sup>[158]</sup>. Allerdings müssen sowohl die Umsetzungsbedingungen als auch die Konzentrationen der Reaktionspartner berücksichtigt werden. Die Inkubation von Sojasauce mit der im Speichel maximal zu erwartenden Menge an Nitrit unter den im Magen vorliegenden Bedingungen führt z. B. zu keiner erhöhten Mutationsrate bei den Teststämmen, obwohl die Verbindungen **142** und **143** in verhältnismäßig großer Menge (50 bzw. 10 ppm) in diesem Lebensmittel vorliegen<sup>[159]</sup>.

Kürzlich wurde über die anticancerogene Wirkung von Maillard-Produkten berichtet<sup>[160]</sup>. Es wird vermutet, daß es zur Reaktion mit Sauerstoff-Radikalen kommt, die dadurch abgefangen und dabei in weniger aggressive Verbindungen umgewandelt werden.

Im Ames-Test haben sich auch die Maillard-Produkte **18**, **25a** und Methylglyoxal als mutagen und **145** und **146** als comutagen erwiesen<sup>[161]</sup>. Wollte man z. B. die Bildung von Substanz **18** verhindern, müßte man weitgehend auf das Erhitzen von Lebensmitteln verzichten!

### 3.6. Nährwertminderungen

Werden Proteine nach dem Erhitzen in Gegenwart von Zuckern verfüttert, dann kann es zu Wachstumsverzögerungen kommen. Umfangreiche Untersuchungen darüber wurden mit Milchproteinen durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß durch Reaktion des Zuckers mit der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenkette teilweise Produkte gebildet werden, die der Organismus nicht mehr verwerten kann. Dies ist gleichbedeutend mit einer Nährwertminderung, da die essentielle Aminosäure Lysin betroffen ist. Eindeutig bewiesen ist, daß die Bildung des Amadori-Produkts **3c** dazu führt, daß nach Proteolyse des Proteins im Verdauungstrakt das Lysin-derivat **3a** für den Organismus wertlos ist<sup>[162]</sup>. Diese Ergebnisse führten dazu, daß bei der Herstellung von Milchpulvern und anderen bevorzugt in der Kinderernährung eingesetzten Produkten darauf geachtet wird, die Lysinschädigung möglichst gering zu halten. Die guten Komplexeigenschaften der Amadori-Produkte führen z. B. zu einer vermehrten Zn-Ausscheidung im Urin nach parenteraler<sup>[11a]</sup> oder oraler<sup>[163]</sup> Gabe dieser Verbindungen. Bei oraler Zufuhr der Reaktionsgemische stellte sich heraus, daß auch Folgeprodukte der Aminoketosenen diese Eigenschaften haben (vgl. Substanz **71**)<sup>[164]</sup>.

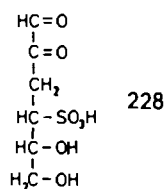
Die Resorptionsrate von höhermolekularen Maillard-Produkten aus Umsetzungsgemischen von Pentosen und Hexosen mit Aminosäuren ist bei Ratten sehr niedrig<sup>[165]</sup>; bei Bräunungsgemischen von Proteinen und Zuckern ist sie höher. Die enzymatische Hydrolyse des Proteins im Verdauungstrakt ist durch die Maillard-Reaktion zwar beeinträchtigt, aber nicht unterbunden<sup>[166]</sup>.

### 3.7. Hemmung der Maillard-Reaktion

Werden sterile Lösungen von Glucose und Aminosäuren zur Herstellung von Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung kalt gemischt und bei 2 °C im Kühlschrank gelagert, kann man nach zwei bis drei Wochen Aminoketosenen des Typs **3** nachweisen und nach zwei Monaten bereits eine leicht-

te Gelbfärbung feststellen<sup>[11]</sup>. Diese Situation läßt sich auf viele Lebensmittel übertragen. Soll die Maillard-Reaktion unterdrückt werden, so läßt sich dies durch Zusatz von Sulfiten<sup>[167]</sup> oder unter bestimmten Voraussetzungen durch Absenken des Wassergehaltes oder der Wasseraktivität erreichen<sup>[168]</sup>. Allerdings sind diese Verfahren nicht auf alle Lebensmittel anwendbar.

Es ist schon länger bekannt, daß Schweflige Säure die Maillard-Reaktion hemmt. Man kann annehmen, daß es zur Addition des Sulfits an Carbonylgruppen kommt<sup>[169a]</sup>. Diese sind dann blockiert und stehen für Folgereaktionen nicht mehr zur Verfügung. Die Reaktionen sind nicht immer reversibel, denn ein Teil des Sulfits bleibt z. B. in höhermolekularen Reaktionsprodukten gebunden<sup>[169b]</sup>. Eines der wenigen bisher isolierten und identifizierten Produkte hat die Struktur **228**<sup>[169a]</sup>. Man kann annehmen, daß das Zwischenprodukt **17** mit Sulfite reagiert hat. Die Maillard-Reaktion wird auch durch Schwefel(II)-Verbindungen wie Thioglycolsäure oder Cystein gehemmt<sup>[170]</sup>. Da der Zusatz von S-haltigen Verbindungen starke Aromaveränderungen in Lebensmitteln erwarten läßt, ist deren Einsatz in der Praxis kaum möglich.



Auf die Hemmung der Maillard-Reaktion in vivo durch Aminoguanidin wird in Abschnitt 6.2 eingegangen.

## 4. Bildung von Amadori-Produkten unter physiologischen Bedingungen

### 4.1. Reaktion von Glucose mit Proteinen

Daß die Maillard-Reaktion auch in vivo abläuft, wurde erst durch die Entdeckung der chromatographischen Heterogenität des Hämoglobins deutlich. So wurden bei der Chromatographie von humanem Hämoglobin an schwach-sauren Ionenaustauschern drei Hämoglobinfractionen ( $\text{HbA}_{1a}$ ,  $\text{HbA}_{1b}$  und  $\text{HbA}_{1c}$ ) vor der Hauptfraction  $\text{HbA}_0$  eluiert<sup>[171]</sup> (Abb. 1). Diese schnellen Hämoglobine (Sammelbegriff  $\text{HbA}_1$ ), die normalerweise nur 5–8% des Gesamt-Hämoglobins ausmachen, haben die gleiche Aminosäuresequenz wie  $\text{HbA}_0$ . Sie unterscheiden sich nur durch zusätzliche, kovalent gebundene niedermolekulare Substanzen. Die Strukturaufklärung des  $\text{HbA}_{1c}$  erweckte besonderes Interesse, als zufällig gefunden wurde, daß diese Substanz vermehrt im Blut von Diabetikern vorkommt<sup>[173]</sup>. Durch Periodatspaltung konnte nachgewiesen werden, daß die in  $\text{HbA}_{1c}$  gefundene Hexose als 1-Amino-1-desoxyfructose **3b** am N-terminalen Valin der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins gebunden ist<sup>[174]</sup>. Da  $\text{HbA}_{1c}$  auch durch in-vitro-Inkubation von  $\text{HbA}_0$  und Glucose erhalten werden kann<sup>[175]</sup>, war klar, daß die Synthese von  $\text{HbA}_{1c}$  über die Addition von Glucose an die N-terminale Aminogruppe des Hämoglobins zur Schiff-

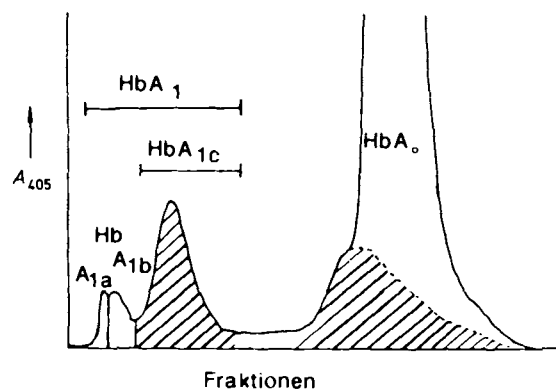
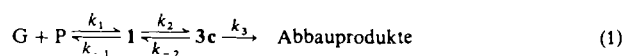


Abb. 1. Elutionsprofil von humanem Hämoglobin nach Chromatographie an schwach saurem Ionenaustauscher. Bei der Chromatographie eluiert die Hämoglobinfraction  $\text{HbA}_{1c}$ , die Glucose in Form von **3b** enthält, vor der Hauptfraction  $\text{HbA}_0$ . Neuerdings wurde gezeigt, daß die  $\text{HbA}_0$ -Fraction auch fructosyliertes Hämoglobin enthält, bei dem allerdings die Glucose in Form von **3a** gebunden ist<sup>[172a]</sup>. Die Zusammensetzung der Hämoglobinfractionen  $\text{HbA}_{1a}$  und  $\text{HbA}_{1b}$  sind zum Teil noch nicht bekannt. Die schraffierten Bereiche kennzeichnen Erhöhungen bei erhöhten Blutglucosekonzentrationen.  $A_{405}$  = Absorption bei 405 nm.

sehen Base **1** und nachfolgende Amadori-Umlagerung zu **3** verläuft. Diese Reaktion wird als nichtenzymatische Glucosylierung von Proteinen bezeichnet. Im angelsächsischen Sprachraum wird neben der Bezeichnung „nonenzymatic glucosylation“ auch „glycation“ verwendet.

Der Begriff „Fructosamin“ wird im medizinischen Sprachgebrauch synonym für 1-Amino-1-desoxyfructose **3** verwendet. Nachfolgend soll, da die entstandene Amadori-Verbindung immer eine 1-Amino-1-desoxyfructose ist, von Fructosylierung gesprochen werden. Bevorzugte Fructosylierungsstelle ist beim Hämoglobin der Aminoterminus der  $\beta$ -Kette. Der Aminoterminus der  $\alpha$ -Ketten wird 8–10mal weniger fructosyliert<sup>[172]</sup>. Von den 22  $\epsilon$ -Aminogruppen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten werden drei bevorzugt fructosyliert. Es fällt auf, daß die nichtenzymatische Fructosylierung eine unerwartete Spezifität zeigt, bei welcher der  $pK_a$ -Wert der Aminogruppen anscheinend eine untergeordnete Rolle spielt. Als Ursache für diese Spezifität wurde eine limitierende sterische Zugänglichkeit der Glucose zur reaktiven Aminogruppe diskutiert. Inzwischen gibt es Hinweise darauf, daß die Spezifität auch mit einer Säure-Base-Katalyse der Amadori-Umlagerung durch nahegelegene Protonendonator-Acceptor-Gruppen erklärt werden kann<sup>[172]</sup>. Wie in Gleichung (1) allgemein dargestellt ist, reagiert Glucose (G) mit den freien Aminogruppen eines Proteins (P) unter Bildung einer Schiff-schen Base **1**. Nach Umlagerung zur relativ stabilen Amino-fructose **3c** bleibt das fructosylierte Protein im Körper, bis es abgebaut wird<sup>[176]</sup>. Die jeweils im Körper vorhandene Menge an fructosyliertem Protein stellt die „steady-state“-Konzentration  $[\mathbf{3c}]_{ss}$  dar.



Im stationären Zustand gilt, wenn  $k_{-2} \ll k_2$ <sup>[165]</sup>, Gleichung (2).

$$\frac{[\mathbf{3c}]_{ss}}{[P]} = \frac{k'_2}{k_3} [G] \quad (2)$$

$$k'_2 = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} \quad (3)$$

Die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion ist durch Gleichung (3) gegeben, und die der Abbaureaktion beträgt  $k_3$ . Die Proteinhalbwertszeit läßt sich durch die Beziehung  $t_{1/2} = \ln 2/k_3$  berechnen. Der Anteil des fructosylierten Proteins (Fructosylierungsgrad) ist also im stationären Zustand proportional der Glucosekonzentration und dem Verhältnis der Bildungs- und Abbaukonstanten. Da der Fructosylierungsgrad im stationären Zustand und die Geschwindigkeitskonstante  $k'_2$  für jedes Protein gemessen werden können, läßt sich bei gegebener, konstanter Glucosekonzentration (im menschlichen Körper ca. 4.4 mM) die Abbaukonstante und damit auch die Proteinhalbwertszeit berechnen. Umgekehrt ist bei Kenntnis der Abbaugeschwindigkeit der Fructosylierungsgrad eines Proteins ein Maß für die Glucosekonzentration, der dieses Protein während seiner „Lebenszeit“ ausgesetzt war.

Weiterhin müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein: 1. Das Protein muß in vivo für die Glucose frei zugänglich sein (gilt für Blutproteine und Proteine insulininsensitiver Zellen, bei denen der Glucoseeintransport schneller als der Glucoseverbrauch ist). 2. Die in-vivo-Kinetik muß der in-vitro-Kinetik entsprechen. Die Fructosylierung kann dann als endogene, nicht radioaktive „Markierung“ von Proteinen angesehen werden, die zur Abschätzung der Protein-Halbwertszeit verwendet werden kann.

Bestimmt man den Fructosylierungsgrad im stationären Zustand von menschlichen Proteinen, die aus Serum von Normalpersonen gereinigt wurden, und mißt in vitro die entsprechende Geschwindigkeitskonstante  $k'_2$ , so kann die Proteinhalbwertszeit berechnet werden<sup>[176]</sup>. Einige Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die über die in-vitro-Kine-

Tabelle 1. Vergleich der berechneten Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von Proteinen mit bekannten Werten. Die Geschwindigkeitskonstante  $k'_2$  und der Fructosylierungsgrad im stationären Zustand wurden in vitro ermittelt.

	mittlerer Fructosylierungsgrad		$k'_2$ [mM <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	$t_{1/2}$ [d] berechnet nach [b]	
	nmol lys-fru [a] pro mg Protein	mol lys-fru pro mol Protein			
Albumin	3.6	0.25	0.04	14.04	12–20
γ-Globulin	1.6	0.25	0.017	14.6	15–26
Fibrinpeptid	0.86	0.2	0.048	3.0	4–5.5
LDL[c]	1.2	0.5	0.04	4.68	3.1–3.4
HDL[d]	1.8	0.1	0.05	5.62	4.2–4.8
Hämoglobin	2.0	0.13	0.023	13.6	70

[a] Bindung an ε-Aminogruppen von Lysinen; Struktur 3c. [b] Aus  $t_{1/2} = \ln 2/k_3$ . [c] Low Density Lipoprotein (Cholesterin-transportierendes Protein). [d] High Density Lipoprotein (Cholesterin-abtransportierendes Protein).

tik berechneten Halbwertszeiten von Serum-Proteinen stimmen gut mit beschriebenen Werten<sup>[177]</sup> überein. Der niedrige Wert für Hämoglobin hängt damit zusammen, daß das Hämoglobin im roten Blutkörperchen nicht in Lösung, sondern als Konzentrat vorliegt (330 mg mL<sup>-1</sup>).

Bei Über- oder Unterfunktion der Schilddrüse, bei denen der Proteinturnover erhöht bzw. vermindert ist, wurde tatsächlich ein verminderter bzw. erhöhter Fructosylierungsgrad des cholesterintransportierenden menschlichen Serumlipoproteins LDL gefunden<sup>[176b]</sup>. Besonders interessant ist die Beobachtung, daß der Fructosylierungsgrad des LDL von Normalpersonen mit dem LDL-Cholesterinblutspiegel korreliert: Eine Verdoppelung des LDL-Spiegels geht in et-

wa mit einer Verdoppelung des Fructosylierungsgrades des LDL einher<sup>[176b]</sup> (vgl. Abschnitt 5.2). Abbildung 2 zeigt Ergebnisse einer Modellreaktion, die den in-vivo-Proteinturnover simuliert<sup>[176b]</sup>. Es wurde eine Albuminlösung mit zwei Glucosekonzentrationen inkubiert und täglich 1/20 der Lösung durch Ausgangsmittel ersetzt. Diese tägliche „Ab-

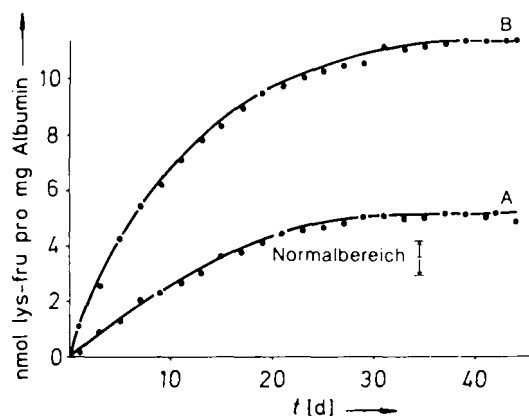
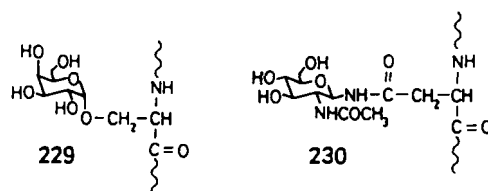


Abb. 2. Simulation des menschlichen Proteinturnovers im Reagensglas. Humanes Serumalbumin wurde mit 7.2 (A) bzw. 14.4 (B) mM D-Glucose inkubiert. Täglich wurde 1/20 des Inkubationsansatzes entnommen und durch Ausgangsmittel ersetzt. Weitere Einzelheiten sind im Text beschrieben.

baumenge“ von 5% entspricht einer Halbwertszeit von 13.8 d bei einer Eliminierungskinetik erster Ordnung. Als Grenzkonzentration zwischen normalen und erhöhten Blutzuckerwerten wurde 7.2 mM, als diabetische Konzentration wurde 14.4 mM Glucose gewählt. Nach 40 d ist das Gleichgewicht annähernd eingestellt. Der Fructosylierungsgrad für 7.2 mM Glucose beträgt im stationären Zustand 5.1 nmol lys-fru pro mg Albumin, während bei der doppelten Glucosekonzentration etwa der doppelte Fructosylierungswert erhalten wird (lys-fru kennzeichnet Struktur 3c). Aus diesen Werten kann man abschätzen, daß zur in-vitro-steady-state-Fructosylierung von 3.6 nmol pro mg Albumin eine Glucosekonzentration von ca. 5 mM nötig wäre. Diese Glucosekonzentration stimmt gut mit der mittleren Glucosekonzentration von Normalpersonen (4.4 mM) überein, d. h. die in-vitro-Reaktionsbedingungen geben die Verhältnisse im Körper relativ gut wieder.

## 4.2. Strukturvergleich von enzymatisch glycosylierten und nichtenzymatisch fructosylierten Proteinen

In vielen Glycoproteinen sind Kohlenhydrate (z. B. Galactose) O-glycosidisch an Serin oder Threonin der Peptidkette gebunden (vgl. Struktur 229). Bislang wurde nur ein Typ einer N-glycosidischen Bindung charakterisiert: die N-gly-



cosidische Bindung von *N*-Acetylglucosamin<sup>[178]</sup> an das Amidstickstoffatom von Asparagin (vgl. Struktur **230**).

Die Fructosylierung von Proteinen findet dagegen im wesentlichen an den freien Aminogruppen der Lysinreste statt<sup>[179]</sup> (vgl. Struktur **3c** und Abschnitt 4.1). Die Konformation von fructosylierten Proteinen in wäßriger Lösung wurde <sup>13</sup>C-NMR-spektroskopisch untersucht<sup>[180]</sup>. Als Modellprotein wurde RNase A aus Rinderpankreas verwendet. Entsprechend der Ringbildung freier Hexosen liegen die Protein-gebundenen Hexosen fast ausschließlich cyclisiert vor. Sowohl das Glucosylamin **1** als auch das Ketosamin liegen bevorzugt als  $\beta$ -Anomer in pyranosider Form vor (siehe Strukturformeln in Abschnitt 2.4). Da die Referenzverbindungen *N*- $\alpha$ -Formyl- $\epsilon$ -fructoselysin und fructosyliertes Poly-L-lysin entsprechende Resonanzen wie fructosyliertes Enzym (RNase) zeigten, scheint der Einfluß der Proteinmatrix auf die Konformation der Hexose gering zu sein.

### 4.3. Methoden zur quantitativen Bestimmung von fructosylierten Proteinen

Da viele in der Lebensmittelchemie angewendete Methoden für den Nachweis und die Bestimmung der in vivo fructosylierten Proteine viel zu unempfindlich und zu unspezifisch sind, wurde eine Reihe von alternativen Methoden entwickelt. Die meisten der in Abbildung 3 dargestellten Nachweisreaktionen verlaufen nicht stöchiometrisch; sie

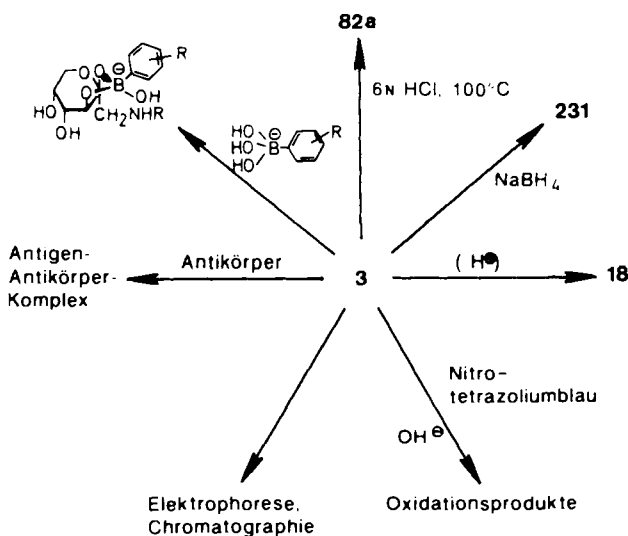
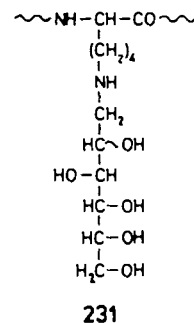


Abb. 3. Reaktionswege zum Nachweis von fructosylierten Proteinen. Auf der rechten Seite sind die Reaktionswege, die unter Veränderung der Struktur **3** und auf der linken Seite die Reaktionswege, die ohne Veränderung von **3** ablaufen, dargestellt.

sind daher keine absoluten, sondern relative Meßmethoden. Theoretisch sollte eine Quantifizierung von **3** im Proteinverband nach Hydrolyse des Proteins möglich sein. Allerdings ist **3** unter stark sauren Hydrolysebedingungen nicht stabil; man erhält ca. 50% freies Lysin und ca. 30% **82a** (vgl. Abschnitt 2.5.4). Es konnte gezeigt werden<sup>[64]</sup>, daß das mit einem Aminosäureanalysator gemessene **82a** als Maß für die Hitzeschädigung von Lebensmitteln, insbesondere von Milchprodukten, durch nichtenzymatische Bräunung ver-

wendet werden kann. Wesentlich geringere Mengen an **82a** lassen sich durch HPLC-Analyse nachweisen<sup>[181]</sup>. Mit Hilfe dieser Methode können noch 50 pmol **3c** in 5–25  $\mu$ g Protein spezifisch und präzise bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil der Methode ist, daß auch unlösliche Gewebe (z. B. Collagen) untersucht werden können.

Fructosylierte Proteine können auch nach Reduktion mit Natriumborhydrid zu **231** und Hydrolyse – dabei dehydratisiert **231** beträchtlich – im Aminosäureanalysator bestimmt



werden, wobei zur Erhöhung der Sensitivität meist tritiiertes Natriumborhydrid nötig ist. Die in der Lebensmittelchemie übliche Bestimmung von **18**, das nach leicht saurer Hydrolyse aus **3** entsteht (vgl. Abschnitt 2.5.2), kann nur unter speziellen Bedingungen genutzt werden<sup>[182, 183]</sup>.

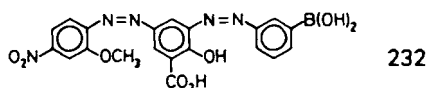
Relativ früh wurde das charakteristische Reduktionsverhalten von Amadori-Verbindungen zu ihrem Nachweis genutzt<sup>[3a, 6]</sup>. In alkalischer Lösung enolisiert **3** zum stark reduzierenden Enaminol **5**, das sich durch Redoxindikatoren wie Dichlorphenolindophenol nachweisen und quantifizieren läßt. Da das entstehende Reduktionsmittel ebenfalls reduzierende Eigenschaften hat, ist erstens die Stöchiometrie der Reaktion nicht eindeutig und zweitens der Endpunkt der Reaktion nicht klar definiert. Zur Lösung dieser Probleme wurde vorgeschlagen, die Reaktion kinetisch unter Verwendung von Nitrotetrazoliumblau als Reduktionsmittel zu messen<sup>[184]</sup>. Dabei zeigte sich, daß bei pH = 10.3 weder Glucosylamine noch freie Glucose merklich mitreagieren. Durch entsprechende Wahl des Zeitfensters ließ sich die Spezifität verbessern, da andere reduzierende Substanzen im menschlichen Serum im wesentlichen innerhalb der ersten zehn Minuten reagieren.

Die zur Entdeckung der fructosylierten Hämoglobine führende  $pK_a$ -Änderung des Valin-fructosylierten Hämoglobins **3b** wurde anfangs verwendet, um **3b** durch Ionenaustauschchromatographie, Elektrophorese oder isoelektrische Fokussierung zu trennen und zu quantifizieren<sup>[185]</sup>. Da, wie bereits erwähnt, die meisten Proteine im wesentlichen an den  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysine fructosyliert sind (vgl. Struktur **3a**), die eine wesentlich geringere  $pK_a$ -Änderung aufweisen, sind diese Methoden nicht allgemein anwendbar (vgl. Abb. 1). Versuche, **3** mit Phenylhydrazin als Carbonylreagens nachzuweisen, scheiterten wegen ungenügender Reaktivität und Sensitivität<sup>[186]</sup>.

Obwohl viele Protein-gebundene Zucker außerordentlich antigen sind, zeigten frühe Versuche, daß **3** nur nach Reduktion zu **231** antigen ist. Die Bindung der gegen **231** gerichteten Antikörper ist aber, wahrscheinlich wegen sterischer Hinderung, nicht bei allen fructosylierten Proteinen quanti-

tativ, so daß die Methode nicht allgemein anwendbar ist<sup>[187]</sup>.

Fructosylierte Aminosäuren und Peptide binden unter Bildung von Borsäureestern spezifisch matrixgebundene Borsäure (vgl. Abb. 3) und können nach Elution mit Säure oder Sorbit quantifiziert werden<sup>[188]</sup>. Dieses Verfahren ist aber nur für wenige Proteine anwendbar – wahrscheinlich wegen sterischer Hinderung. Eigene Untersuchungen zeigten, daß Borsäureester auch mit substituierten Phenylboronsäuren in homogener wäßriger Lösung gebildet werden<sup>[189]</sup>. Da sich das Absorptionsmaximum von **232** nach Esterbildung zu kürzeren Wellenlängen verschiebt, kann **3** photometrisch



quantifiziert werden. Die vielen beschriebenen Methoden zeigen, daß es keine allgemein anwendbare Methode zur präzisen und spezifischen Bestimmung von fructosylierten menschlichen Körperproteinen gibt, so daß die jeweils geeignete Methode für das zu messende Protein auszuwählen ist.

#### 4.4. Vorkommen fructosylierter Proteine im menschlichen Blut und Gewebe

Erst in diesem Jahrzehnt wurde erkannt, daß viele menschliche Proteine fructosyliert sind. Vor etwa zehn Jahren wurde gezeigt<sup>[190]</sup>, daß auch humanes Serumalbumin fructosyliert ist. Wie bei Hämoglobin findet man auch beim Albumin eine relative Spezifität des Fructosylierungsortes. Nur 9 von 55 ε-Aminogruppen sind meßbar fructosyliert, davon ist Lys-525 am stärksten betroffen (50% der Gesamtfructosylierung). Weitere Werte für Blutproteine sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Da Diabetiker höhere Blutzuckerspiegel (Faktor ca. 2–5) haben, können manche Proteine von Diabetikern pro mol mehr als 1 mol Fructose gebunden enthalten. Natürlich sind auch andere Plasmaproteine wie α<sub>1</sub>-Antitrypsin, Fibronectin, Plasminogen, Antithrombin-III, ApoE, ApoC II meßbar, aber unter anderem wegen ihrer geringen Halbwertszeit (Stunden, 1–3 d) nur gering fructosyliert<sup>[191]</sup>. Nicht nur die gelösten Proteine, sondern auch membrangebundene Proteine werden fructosyliert, wie am Beispiel der Erythrocytenmembranproteine gezeigt wurde<sup>[192]</sup>. Bei menschlichen Gewebeproteinen hängt der Fructosylierungsgrad auch davon ab, ob die Glucose Zutritt zu den Proteinen hat (z. B. bei extrazellulären Proteinen wie Bindegewebe) oder ob (z. B. bei intrazellulären Proteinen) die Glucosekonzentration in der Zelle sehr niedrig ist. Dies gilt vor allem für insulinresistente Gewebe, d. h. Gewebe, bei denen die Glucoseaufnahme Insulin-reguliert ist. Entsprechend wurden weder in Herz- noch in Skelettmuskeln Hinweise für eine Fructosylierung der Proteine gefunden<sup>[193]</sup>.

Dagegen konnte **3c** in Insulin-insensitiven Geweben wie Nervengewebe nachgewiesen werden<sup>[193]</sup>. Besonders gut untersucht sind Gewebe, die Collagene enthalten. In Abbildung 4 ist der Gehalt an **3c** in Sehnen, Aortenwand, in Lungenbindegewebe und in glomerulären Basalmembranen wiedergegeben. Auch in Haut- und Knochengewebe sowie in Haaren

und in Fingernägeln wurde **3c** nachgewiesen (vgl. Abschnitt 6.1). Die Mittelwerte für die Gewebe von Normalpersonen entsprechen in etwa einer Fructosylierung von 1–3% aller Lysinreste. Die Mittelwerte von Diabetikern streuen entsprechend der unterschiedlichen Stoffwechseleinstellung stärker als die von Nicht-Diabetikern. Die Fructosylierungsgrade verschiedener Gewebe korrelieren gut untereinander: Patienten mit hoher Fructosylierung der Sehnen weisen auch eine hohe Fructosylierung der anderen Gewebe auf. Auch der mittlere Blutzuckerspiegel korreliert erstaunlich gut mit dem Fructosylierungsgrad der Gewebe.

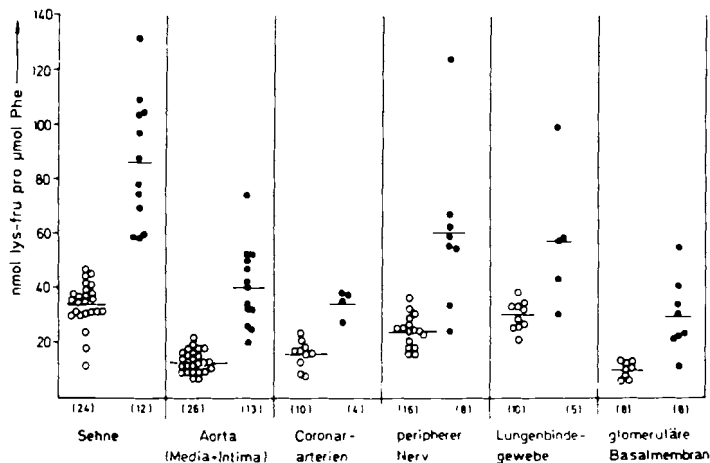


Abb. 4. Nichtenzymatische Fructosylierung von Geweben diabetischer (●) und nichtdiabetischer (○) Patienten. Der eingezeichnete Querstrich stellt das jeweilige arithmetrische Mittel dar. Die Fallzahlen sind in Klammern angegeben. Die Werte sind als nmol lys-fru pro μmol Phenylalanin, das als Bezugsgröße dient, angegeben. Die glomeruläre Basalmembran ist die aus Collagen bestehende Dialysemembran der Niere.

Besonders interessant ist die Frage, ob das Ausmaß der Fructosylierung der Proteine, insbesondere der Bindegewebsproteine, im Laufe des Lebens zunimmt. Während in einer Untersuchung<sup>[194]</sup> eine Verdoppelung des Fructosylierungsgrades von menschlichem Sehnencollagen im Laufe des Lebens beschrieben wurde, zeigten Untersuchungen mit spezifischeren Methoden eine geringere Erhöhung (ca. 50%) der Fructosylierung von Sehnen- und Aortengewebe<sup>[176b]</sup>. Eine sehr deutliche Abhängigkeit des Fructosylierungsgrades vom Lebensalter ist dagegen bei den Linsenproteinen des Auges beschrieben<sup>[195]</sup>.

Da nach bisherigen Erkenntnissen fructosylierte Aminosäuren im Säugetierorganismus nicht metabolisiert werden können (vgl. Abschnitt 3.6) und da sie gut wasserlöslich sind, sollten sie im wesentlichen über den Urin ausgeschieden werden. Tatsächlich scheiden Normalpersonen beträchtliche Mengen an fructosylierten Aminosäuren aus – etwa 0.1 bis 0.3 mmol pro Tag<sup>[188, 196]</sup>. Da Nahrungsmittel zum Teil erhebliche Mengen an freiem oder gebundenem Fructoselysin **3a** bzw. **3c** enthalten, war fraglich, ob die ausgeschiedenen fructosylierten Aminosäuren nicht teilweise daher stammen. Gegen diese Annahme spricht, daß nach 24stündigem Hungern die Ausscheidung unverändert war und nach 10tägigem Hungern sogar anstieg. Dieser Anstieg ist auf erhöhten Eiweißabbau (kataboler Zustand) zurückzuführen. Im Tierexperiment wurde gezeigt, daß von außen zugeführte fructosylierte Aminosäuren und Proteine von Mikroorganismen im



Darm abgebaut werden. Säugetiere können fructosylierte Aminosäuren nicht verwerten. Diabetiker scheiden entsprechend ihrer Stoffwechseleinstellung vermehrt Fructoselysin im Urin aus<sup>[188, 196]</sup>.

#### 4.5. Kommt es auch in vivo zu Folgereaktionen? Bildung von „Advanced Glucosylation End Products“ (AGE)

Besonders interessant war die Frage, ob das Amadori-Produkt **3** – entsprechend der Bräunungsreaktion bei lebensmittelchemischen Prozessen – auch in vivo weiterreagiert und so einen möglichen Mechanismus des Alterns von langlebigen Proteinen im Körper aufzeigt. Als erster Hinweis wurde bei Sehnen collagen ein linearer Anstieg einer für Bräunungspigmente spezifischen Fluoreszenz mit dem Lebensalter gefunden<sup>[197]</sup>. Proben von Diabetikern fielen nicht in den Normalbereich, sondern zeigten erhöhte Fluoreszenz. Da **3** nicht fluoresziert, müssen Folgeprodukte entstanden sein. In Modellreaktionsgemischen von Rinderserumalbumin und Glucose konnte nach 30 d eindeutig eine entsprechende Fluoreszenz nachgewiesen werden<sup>[198]</sup>. Aus der nach Säurehydrolyse des Proteins erhaltenen Lösung wurde das fluoreszierende Produkt **88** isoliert. Wie bereits in Abschnitt 2.5.4 ausgeführt, dürfte es sich um ein Artefakt handeln. Inzwischen konnte der Pyrrolaldehyd **25b** in einer Reihe von nativen Proteinen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und so das Vorkommen von Folgeprodukten von **3** in vivo eindeutig gezeigt werden<sup>[30]</sup> (Bildungsmechanismus vgl. Abschnitt 2.5.1).

Als weiteres in vivo vorkommendes Abbauprodukt wurde Carboxymethyllysine **128** nachgewiesen (vgl. Abschnitt 2.6.2). Damit kann die schon länger bekannte Ausscheidung von **128** im Urin<sup>[199]</sup> erklärt werden. Diese Verbindung bildet sich auch in Augenlinsen, wobei die Konzentration linear mit dem Alter ansteigt<sup>[199]</sup>. In vitro wurde die interessante Beobachtung gemacht, daß aus **3a** unter Sauerstoffausschluß mehr Bräunungspigment als unter Sauerstoffbeteiligung, aber kein **128** entsteht<sup>[77]</sup>. Man schlug daher vor, die Ausscheidung von **128** als allgemeinen Marker für die Beurteilung des Alters des extrazellulären Proteins und das Verhältnis der Ausscheidung von **3a/128** als Marker für den oxidativen Streß im menschlichen Körper zu verwenden<sup>[199]</sup>. In einer Modellreaktion wurde inzwischen **39** als ein weiterer Pyrrolaldehyd nachgewiesen<sup>[200]</sup>, dessen möglicher Bildungsmechanismus bereits beschrieben wurde (vgl. Abschnitt 2.5.1). In Anwesenheit von Natriumsulfit akkumuliert Verbindung **39**. In Abwesenheit von Sulfit bildet **39** sehr schnell mit den freien Aminogruppen von Proteinen Quervernetzungen. Man kann annehmen, daß Verbindungen des Typs **233** entstehen.

Inzwischen konnte auch aus menschlichen Sehnen das Maillard-Produkt **167** isoliert werden<sup>[101]</sup>. Aus der Struktur

dieses Quervernetzungsprodukts läßt sich ableiten, daß Lysin, Arginin und eine Pentose reagiert haben. Da bisher keine Kenntnisse über die Rolle von Arginin und von Pentosen bei der Maillard-Reaktion in vivo vorliegen, kann die Bedeutung von **167** für die Quervernetzung von Proteinen noch nicht abgeschätzt werden.

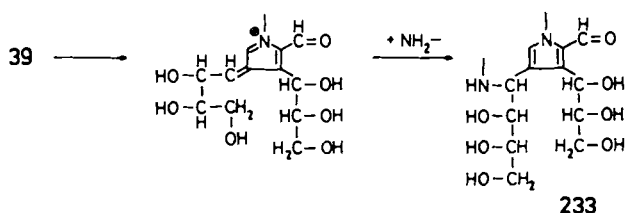
Die Maillard-Reaktion spielt nicht nur bei Proteinen, sondern auch bei Nucleinsäuren eine Rolle<sup>[201]</sup>: Die Inkubation von DNA mit reduzierenden Zuckern führt zur Bildung von braunen Fluoreszenzfarbstoffen, die ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie AGE-Proteine haben. Derart veränderte DNA (AGE-DNA) zeigt nach Transkription spezifische Mutationen, die durch Insertionen oder Deletionen bedingt sind, sowie eine Quervernetzung zwischen Proteinen und DNA. Ob eine solche Protein-AGE-DNA-Quervernetzung in menschlichen Zellen stattfindet, wurde bislang nicht bewiesen, ist aber nicht unwahrscheinlich.

## 5. Führt die Maillard-Reaktion zu Änderungen von Struktur und Funktion von Proteinen?

### 5.1. Einfluß auf die Struktur von Proteinen

Mit der Fructosylierung von Linsenproteinen, die aus Rinderaugenlinsen gewonnen wurden, geht eine Trübung des Linsenkrystallins einher<sup>[202]</sup>. Da diese Trübung bei Anwesenheit von Reduktionsmittel nicht auftritt, wird angenommen, daß die Fructosylierung eine Konformationsänderung nach sich zieht, die reaktive Sulfhydrylgruppen exponiert und so eine Dimerisierung der Proteine ermöglicht. In Katarakten (Linsentrübungen) von diabetischen und galactosämischen Ratten konnten disulfidverbrückte Linsenkrystallin-Aggregate nachgewiesen werden<sup>[203]</sup>. Da nach Ergebnissen anderer Studien Linsenkrystalline zeit- und konzentrationsabhängig fructosyliert werden, liegt es nahe anzunehmen, daß die Maillard-Reaktion eine Rolle bei der Entwicklung einer Linsentrübung im Alter oder bei Diabetikern spielt.

Da für die Quervernetzung der langlebigen Bindegewebsproteine Collagen und Elastin freie Lysingruppen von essentieller Bedeutung sind, wurde der Zusammenhang zwischen Fructosylierung und den Eigenschaften von Collagen ausführlich untersucht. Bei der physiologischen Collagen-Quervernetzung oxidiert eine Lysyloxidase spezifisch einige wenige Lysyl- und Hydroxyllysylreste zu entsprechenden Aldehyden, die mit  $\epsilon$ -Aminogruppen der benachbarten Collagenmoleküle via Schiff-Basen-Bildung zu Vernetzungen führen. Die Reaktion von Glucose mit einem der Lysin- oder Hydroxyllysylreste müßte die Reaktion inhibieren und so zu einer verringerten Quervernetzung der Collagene führen. Tatsächlich wurde aber der umgekehrte Effekt gefunden. Zur Erklärung der experimentellen Befunde müssen daher andere Mechanismen herangezogen werden. Wie bereits beschrieben (vgl. Abschnitt 4.5), können fructosylierte Lysingruppen Quervernetzungen über Folgeprodukte wie **39** und **167** bilden. Solche unphysiologischen Quervernetzungen bilden sich bei Collagenfasern zwischen benachbarten Molekülen und erhöhen die mechanische Stabilität, vermindern aber die Löslichkeit durch Säuren oder Enzyme. Tatsächlich konnte in Modellversuchen gezeigt werden, daß Sehnen, die



mit Glucose inkubiert wurden, mechanisch belastbarer sind. Die Inkubation von Sehnen mit Glucose simuliert die altersabhängige Zunahme der Sehnenzerreizeit<sup>[204]</sup>. Am Beispiel der RNase wurde gezeigt, daß das in vitro fructosylierte Enzym zeitabhängig di- und trimerisiert<sup>[205]</sup>. Dabei bleibt die Quervernetzung selbst nach Entfernung der Glucose bestehen und läßt sich durch gleichzeitige Inkubation mit L-Lysin fast völlig verhindern. Als Reaktionsmechanismus wurde vorgeschlagen, daß eine Aminogruppe des Proteins mit 3a eines anderen Proteins kondensiert und so Quervernetzungen bildet (Struktur 13). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß diese Quervernetzung auch zwischen verschiedenen Proteinen stattfindet<sup>[200, 206]</sup>. Wird Serumalbumin oder Immunglobulin G zu Collagen gegeben, das vorher mit Glucose längere Zeit inkubiert worden ist, so werden sie kovalent gebunden. Tatsächlich findet man bei diabetischen Tieren etwa fünfmal so viel Immunglobulin G an Collagen gebunden wie bei nichtdiabetischen Tieren. Interessanterweise kann das cholesterintransportierende Serumlipoprotein LDL auf diese Art kovalent an fructosyliertes Collagen (z. B. in der Arterienwand) gebunden werden.

## 5.2. Einfluß der Fructosylierung auf die Funktion von Proteinen

Fructosyliert werden vor allem die freien  $\epsilon$ -Aminogruppen von Lysinresten im Proteinverband. Die Aminogruppen der Lysine sind in den aktiven Zentren zahlreicher Enzyme, Carrier-, Bindungs- und Strukturproteine von essentieller Bedeutung. Auch bei Wechselwirkungen zwischen Proteinen, z. B. Hormon/Hormonrezeptor, Antigen/Antikörper, Enzym/Enzyminhibitor, spielen  $\epsilon$ -Aminogruppen eine wichtige Rolle. Daher ist die Hypothese attraktiv, daß eine Fructosylierung von Lysinresten, die sich an strategisch wichtigen Positionen befinden, zu einer Beeinträchtigung der Funktion des betroffenen Proteins führt. Bei der in-vitro-Fructosylierung von Transaminasen nimmt die Aktivität des Enzyms nicht ab<sup>[189]</sup>. Offensichtlich ist das Lysin im aktiven Zentrum, das mit dem Cofaktor Pyridoxalphosphat eine Schiff'sche Base bildet, vor Fructosylierung geschtzt. Dagegen verlieren Ribonuclease A nach 24stndiger Inkubation mit Glucose 50 % und Kathepsin B sowie Papain nach zweiwöchiger Inkubation ca. 70 % der ursprünglichen Enzymaktivität<sup>[207]</sup>. Bei diesen Enzymen scheint die Fructosylierung des Lysins nahe dem aktiven Zentrum Ursache für die Aktivitätsabnahme zu sein.

Es kann aber auch zu Konformationsänderungen kommen, wie am Beispiel der  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase aus Rinderniere gezeigt wurde<sup>[208]</sup>. Nach siebentägiger Inkubation mit 44 mM D-Glucose nimmt die Enzymaktivität bereits um die Hälfte ab. Die getrennte Untersuchung der Isoenzyme A und B ergab, daß das Isoenzym A fast vollständig inaktiviert wird, während B voll aktiv bleibt. Die funktionellen Änderungen sind von strukturellen Änderungen begleitet. So verändert sich nach Fructosylierung die elektrophoretische Mobilität. Das Molekulargewicht nimmt von 130 auf 205 kDa zu. Ob die Aktivitätsabnahme und die strukturelle Veränderung auch in vivo auftreten, ist bislang nicht bekannt. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, daß fructosylierte Proteine schlechter proteolytisch gespalten werden. So scheinen im Verlauf der nicht-enzymatischen

Bräunung die Vernetzungsreaktionen zwischen den Proteinketten auch die enzymatische Spaltbarkeit von Proteinen zu hemmen (vgl. Abschnitte 3.6 und 5.1). Viele Arbeitsgruppen untersuchten den Einfluß der Fructosylierung auf die proteolytische Kaskade der Gerinnung. Die Inhibitorwirkung von Antithrombin III ist nach dreitägiger Inkubation mit 100 mM Glucose beträchtlich vermindert; bei Inkubation mit 400 mM Glucose wird die Thrombinaktivitt durch das so fructosylierte Antithrombin III nur noch zur Hälfte gehemmt. Die eingeschränkte Funktion des Antithrombin III führt zu erhöhter Thrombinaktivitt und infolgedessen zu vermehrter Bildung von Fibrinpeptid. Je höher das Fibrinpeptid fructosyliert ist, desto schlechter wird es durch Plasmin gespalten<sup>[209]</sup>. Daß die Fructosylierung eines Hormons auch seine Wirkung beeinflussen kann, wurde am Beispiel von Insulin gezeigt. Die eingeschränkte Wirkung des fructosylierten Insulins läßt sich an Fettzellen anhand der verringerten Glucoseoxidation, einer vermehrten Fettsureneubildung und reduzierter antilipolytischer Eigenschaften nachweisen<sup>[210]</sup>. Da diese Effekte erst bei sehr hohem Fructosylierungsgrad auftreten, ist die Bedeutung der Ergebnisse für die in-vivo-Situation wahrscheinlich nicht relevant. Das Cholesterin-transportierende LDL im menschlichen Blut enthält normalerweise etwa 0.5 mol lys-fru pro Molekül<sup>[191b]</sup>. Nach in-vitro-Untersuchungen führt die Modifikation von  $\epsilon$ -Aminogruppen des LDL zu einer verminderten Bindung an den Zellmembran-gebundenen LDL-Rezeptor<sup>[211]</sup>. Diese verminderte Bindung, Aufnahme und Metabolisierung von LDL durch verschiedene menschliche Zellen konnte auch für fructosyliertes LDL in Abhängigkeit von der Menge der eingebauten Glucose gezeigt werden. Interessant ist, daß fructosyliertes LDL in humanen Makrophagen die Cholesterinestersynthese stimulieren kann. Es ist daher möglich, daß die Fructosylierung von LDL und die entsprechenden Folgeprodukte (AGE-Produkte) die Bildung von Schaumzellen begünstigen (Makrophagen gelten als Vorstufe der Schaumzellen der atherosklerotischen Plaques). Ob ein Zusammenhang zur interessanten Beobachtung besteht, daß erhöhte LDL-Cholesterinspiegel mit erhöhtem Fructosylierungsgrad einhergehen (vgl. Abschnitt 4.1), ist bislang nicht bekannt.

## 5.3. Immunogenität fructosylierter Proteine und ihrer Folgeprodukte

Mehrere Versuche, Antikörper gegen 3 im menschlichen Blut nachzuweisen, scheiterten. In Tierexperimenten waren fructosylierte Proteine wenig antigen (vgl. Abschnitt 4.3). Da die Menge an AGE-Produkten, die in den verschiedenen langlebigen Krperproteinen gefunden wurde, viel geringer ist, als man anhand der in-vitro-Studien erwarten würde, wurde untersucht, ob im lebenden Organismus AGE-Proteine selektiv entfernt werden. Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, daß immunkompetente Zellen (Makrophagen) einen hochaffinen Rezeptor haben, der AGE-Proteine bindet, in die Zelle aufnimmt und abbaut<sup>[212]</sup>. Dieser Rezeptor für AGE-Proteine konnte aus der Makrophagenmembran herausgelöst und angereichert werden. Allerdings scheint dieses AGE-Protein-Abbausystem nicht vollständig effizient zu sein, denn die Alterungsprodukte akkumulieren über das gesamte Leben des Individuums als Funktion der Zeit und des Blutglucosespiegels.

## 6. Medizinische Aspekte der Maillard-Reaktion

### 6.1. Die Maillard-Reaktion zur Beurteilung der diabetischen Stoffwechsellaage

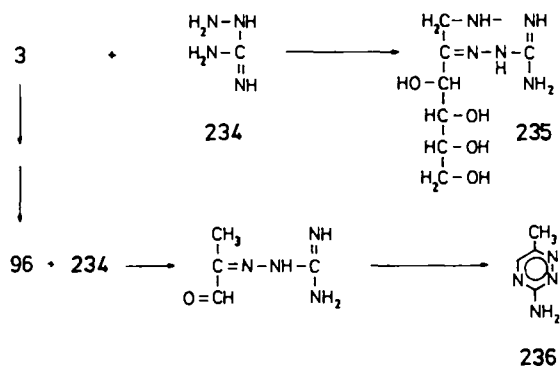
Der Fructosylierungsgrad von Proteinen im menschlichen Körper ist im stationären Zustand der Proteinhalbwertszeit und der Glucosekonzentration proportional (vgl. Abschnitt 4.1). Daher läßt sich – konstante Proteinhalbwertszeit vorausgesetzt – die mittlere Glucosekonzentration, der dieses Protein während seiner Lebensdauer im Körper ausgesetzt war, abschätzen. Der Fructosylierungsgrad eines Blutproteins läßt sich also zur retrospektiven Abschätzung des Blutglucosespiegels verwenden. Die fructosylierten Proteine stellen eine Art Blutzuckergedächtnis dar. Je nachdem, welchen Zeitraum man überschauen möchte, wählt man ein Protein mit entsprechender Halbwertszeit aus. So eignet sich z. B. das Hämoglobin für eine Blutzuckerüberwachung der letzten zwei bis drei Monate, während die Bestimmung der fructosylierten Serumproteine die durchschnittliche Blutglucosekonzentration der letzten zwei bis drei Wochen widerspiegelt. Mit der Furosinsmethode (vgl. Abschnitt 4.3) lassen sich sogar erhöhte Glucosespiegel anhand des Fructosylierungsgrades von Fingernagel- oder Haarproteinen feststellen<sup>[213]</sup>. Die Menge der fructosylierten Blutproteine ist somit ein Maß zur objektiven Erfassung der Stoffwechseleinstellung, von dem in der klinischen Praxis sowohl Arzt als auch Patient profitieren. Der Patient hat eine unbestechliche, motivierende Leitgröße, und der Arzt kann ohne großen Aufwand über eine längere Zeit gemittelte Blutzuckerwerte in Erfahrung bringen, ohne einzelne Blutzuckerwerte zu bestimmen.

Da diabetische Spätschäden vor allem an Insulin-insensitiven Geweben auftreten, wurde die Fructosylierung dieser Gewebeproteine mit dem Ausmaß der Spätschäden verglichen<sup>[193]</sup>. Diabetiker mit schweren Spätschäden an mehreren Organen wiesen einen hohen Fructosylierungsgrad des Sehnen- und des Aortengewebes auf. Dieses Ergebnis deutet auf einen Zusammenhang zwischen schlechter Stoffwechselführung und der Entstehung diabetischer Spätschäden hin. Entsprechend zeigen Diabetiker mit einem hohen Gehalt an AGE-Proteinen in vermehrtem Ausmaß Schäden an Augen und Nieren<sup>[214]</sup>.

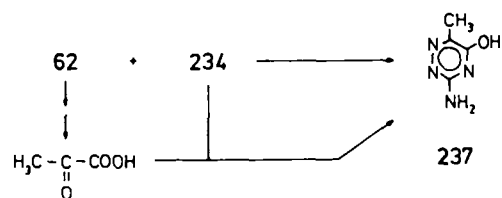
### 6.2. Intervention der Maillard-Reaktion in vivo

Nachdem man die Maillard-Reaktion als eine der Ursachen der unerwünschten glucoseabhängigen Proteinquervernetzung im menschlichen Körper erkannt hat, sucht man nach Möglichkeiten, diese Reaktion zu unterbinden. Seit vielen Jahren verwenden Lebensmittelchemiker Sulfite als Additiv, um die Bildung von Maillard-Produkten zu verhindern (vgl. Abschnitt 3.7). Für die Verwendung im Körper wurde nach einer nichttoxischen Verbindung gesucht, die mit **3** oder anderen Umlagerungsprodukten reagiert. Es konnte gezeigt werden, daß Aminoguanidin **234** die Bildung von AGE-Substanzen und die Quervernetzung von Proteinen sowohl in vitro als auch in vivo inhibiert<sup>[215]</sup>. Nach Aminoguanidingabe wurde keine Akkumulation von Immunglobulinen im Collagengerüst der Blutgefäße von diabetischen Ratten beobachtet. Weitere Untersuchungen ergaben ver-

minderte Quervernetzungen des Collagens und verminderte Anlagerungen von Cholesterin-transportierenden Lipoproteinen an die Arterienwände. Toxizitätsstudien an Säugetieren und an gesunden Menschen zeigten, daß **234** relativ gut verträglich ist. Es ist geplant, **234** als Medikament zur Verhinderung der durch die Maillard-Reaktion bedingten Quervernetzung für die Entstehung sowohl von diabetischen Spätkomplikationen als auch von Alterungsschäden zu prüfen. Es wird angenommen, daß Aminoguanidin bevorzugt mit **3** zu Hydrazonen des Typs **235** reagiert. Bei in-vitro-Versuchen entsteht in gewissem Umfang das Triazin **236**. Als Reaktionsweg ist die Retroaldolreaktion von **3** zu Methylglyoxal **96** und dessen Kondensation mit Aminoguanidin



wahrscheinlich. Bei der Umsetzung des Hydroxyfuranons **62** mit Aminoguanidin im pH-Bereich 7–8 bildet sich das Hydroxytriazin **237**<sup>[216]</sup>. Man kann annehmen, daß aus **62** Brenztraubensäure abgespalten wird, die dann mit Amino-



guanidin zu **237** cyclisiert. In welchem Umfang die Triazine in vivo gebildet werden, muß noch geprüft werden.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Auch 78 Jahre nach ihrer Entdeckung ist die Maillard-Reaktion mit ihrer Fülle von Reaktionswegen und Produkten nicht annähernd aufgeklärt. In der Lebensmittelchemie ist man bestrebt, die Maillard-Reaktion so ablaufen zu lassen, daß die Bildung von toxischen Produkten und die Minderung essentieller Bestandteile unterdrückt wird, während gewünschte Substanzen in optimalem Umfang entstehen.

Obwohl erst vor einigen Jahren bekannt wurde, daß die Maillard-Reaktion auch im menschlichen Körper abläuft, ist bereits eine Reihe von strukturellen und funktionellen Veränderungen bei fructosylierten Proteinen nachgewiesen worden. Allerdings wird es auch in absehbarer Zukunft

schwierig sein, definierte Verbindungen aus der verwirrenden Vielfalt der Maillard-Produkte als Ursache für den komplex ablaufenden Alterungsprozeß ausfindig zu machen. Derzeitiges Ziel ist vor allem, die im menschlichen Organismus unerwünschte Maillard-Reaktion zu hemmen und so die „Verzuckerung“ des Menschen und deren Folgen im Laufe seines Lebens zu verhindern.

*Für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken wir uns bei Prof. Dr. K. D. Gerbitz, Dr. B. Olgemöller und Dipl.-Chem. S. Prytulla, für die vielen kritischen Anmerkungen bei Prof. Dr. T. Severin.*

Eingegangen am 21. Juni,  
veränderte Fassung am 27. November 1989 [A 762]

- [1] L. C. Maillard, *C. R. Acad. Sci. Ser. 2* 154 (1912) 66; *ibid.* 155 (1912) 1554.
- [2] M. Amadori, *Atti R. Acad. Naz. Lincei Mem. Cl. Sci. Fis. Mat. Nat.* 13 (1931) 72.
- [3] a) R. Kuhn, F. Weygand, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* B70 (1937) 769; b) F. Weygand, *ibid.* 73 (1940) 1259.
- [4] H. Simon, A. Kraus, *Fortschr. Chem. Forsch.* 14 (1970) 389.
- [5] K. Heyns, H. Paulsen, R. Eichstedt, *M. Rolle Chem. Ber.* 90 (1957) 2039.
- [6] H. Paulsen, K. W. Pflughaupt in W. Pigman, D. Horton (Hrsg.): *The Carbohydrates: Chemistry and Biochemistry*, Vol. 1B, Academic Press, New York 1980, S. 881.
- [7] Übersichtsartikel: a) T. M. Reynolds, *Adv. Food Res.* 12 (1963) 1; *ibid.* 14 (1965) 167; b) M. Angrick, D. Rewicki, *Chem. Unserer Zeit* 14 (1980) 149; c) C. Eriksson (Hrsg.): *The Maillard Reaction in Foods*, *Prog. Food Nutr. Sci.* 5, Pergamon Press, Oxford 1981; d) G. Waller, M. S. Feather (Hrsg.): *Maillard Reactions in Food and Nutrition*, *ACS Symp. Ser.* 215, American Chemical Society, Washington D. C. 1983; e) G. Westphal, L. Kroh, *Nahrung* 29 (1985) 757, 765; f) W. Baltes, *Lebensmittelchem. Gerichth. Chem.* 40 (1986) 49; g) M. Fujimaki, M. Namiki, H. Kato (Hrsg.): *Amino-carbonyl Reactions in Food and Biological Systems*, *Dev. Food Sci.* 13, Elsevier, Amsterdam 1986; h) M. Namiki, *Adv. Food Res.* 38 (1989) 115; i) J. W. Baynes, V. M. Monnier (Hrsg.): *The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 304, A. R. Liss Inc., New York 1989; j) T. H. Parment, R. J. McGorin, C.-T. Ho (Hrsg.): *Thermal Generation of Aromas*, *ACS Symp. Ser.* 409, American Chemical Society, Washington D.C. 1989; k) P. A. Finot, H. U. Aeschbacher, R. F. Hurrel, R. Liardon (Hrsg.): *The Maillard Reaction in Food Processing*, *Human Nutrition and Physiology*, Birkhäuser, Basel 1990.
- [8] a) R. Wittmann, K. Eichner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188 (1989) 212; b) H. Hashiba, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 1727; c) J. Steinig, A. Montag, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 174 (1982) 453; d) K. Heyns, H. Paulsen, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 622 (1959) 160.
- [9] a) H. Sulser, W. Büchi, *Lebensm. Wiss. Technol.* 2 (1969) 105; b) M. Cinner-Doruk, K. Eichner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168 (1979) 9, 360; c) A. B. Möller, A. T. Andrews, G. C. Cheeseman, *J. Dairy Res.* 44 (1977) 267; d) H. Erbersdobler, *Milchwissenschaft* 25 (1970) 280.
- [10] H. Hashiba, *Agric. Biol. Chem.* 42 (1978) 763.
- [11] a) L. D. Stegink, J. A. Shepherd, L. K. Fry, L. J. Filer, *Pediatr. Res.* 8 (1974) 396; b) B. Huber, H. Krämer, F. Ledl, L. Vogel, *Krankenhauspharmazie* 10 (1989) 168.
- [12] a) J. Beck, F. Ledl, T. Severin, *Carbohydr. Res.* 177 (1988) 240; b) *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188 (1989) 118; c) H. Huber, F. Ledl, *Carbohydr. Res.*, im Druck.
- [13] E. F. L. J. Anet, *Austr. J. Chem.* 10 (1957) 193.
- [14] a) W. Baltes, K. Franke, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167 (1978) 403; b) L. Kroh, G. Westphal, *Z. Chem.* 23 (1983) 293.
- [15] a) J. F. Carson, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 1881, 5957; b) K. Heyns, R. Eichstedt, K. H. Meinecke, *Chem. Ber.* 88 (1955) 1551.
- [16] K. Heyns, G. Müller, H. Paulsen, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 703 (1967) 202.
- [17] W. Nedvidek, F. Ledl, unveröffentlicht.
- [18] M. S. Feather, J. F. Harris, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 28 (1973) 161.
- [19] G. Machell, G. N. Richard, *J. Chem. Soc.* 1960, 1924, 1932, 1938.
- [20] a) E. F. L. J. Anet, *Austr. J. Chem.* 13 (1960) 396; b) *J. Am. Chem. Soc.* 82 (1960) 1502; c) H. Kato, *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 24 (1960) 1.
- [21] a) E. F. L. J. Anet, *Chem. Ind. (London)* 1962, 262; b) *J. Chromatogr.* 9 (1962) 291.
- [22] K. Olsson, P. A. Pernemalm, O. Theander, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 32 (1978) 249.
- [23] J. Beck, F. Ledl, M. Sengl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190 (1990) 212.
- [24] a) E. F. L. J. Anet, *Tetrahedron Lett.* 1966, 1649; b) *Carbohydr. Res.* 2 (1966) 448.
- [25] a) R. Kuhn, G. Krüger, *Chem. Ber.* 90 (1957) 264; b) J. N. BeMiller, R. L. Whistler, *J. Org. Chem. Soc.* 27 (1962) 1161.
- [26] G. R. Jurch, J. H. Tatum, *Carbohydr. Res.* 15 (1970) 233.
- [27] O. Pachmayr, F. Ledl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182 (1986) 294.
- [28] K. Olsson, P. A. Pernemalm, T. Popoff, O. Theander, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 31 (1977) 469.
- [29] H. Sigematsu, T. Kurata, H. Kato, M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.* 35 (1971) 2097.
- [30] F. Hayase, R. H. Nagaraj, S. Miyata, F. G. Njoroge, V. M. Monnier, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 3758.
- [31] a) F. Ledl, M. Sengl, T. Severin, *J. Chromatogr.* 463 (1989) 119; b) U. Schüssler, F. Ledl, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 189 (1989) 32.
- [32] H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* 31 (1967) 1086.
- [33] R. Tressl, B. Helak, D. Rewicki, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 483.
- [34] F. Ledl, U. Krönig, T. Severin, H. Lotter, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 177 (1983) 267.
- [35] F. G. Njoroge, A. A. Fernandes, V. M. Monnier, *J. Carbohydr. Chem.* 6 (1987) 553.
- [36] J. G. Farmar, P. C. Ulrich, A. Cerami, *J. Org. Chem.* 53 (1988) 2346.
- [37] a) T. Severin, U. Krönig, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 152 (1973) 42; b) S. Estendorfer, F. Ledl, T. Severin, unveröffentlicht; c) U. Krönig, *Dissertation*, Universität München 1974; d) S. Estendorfer, F. Ledl, T. Severin, *Angew. Chem.* 102 (1990) 547; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 536.
- [38] J. Hiebl, F. Ledl, T. Severin, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 990.
- [39] T. Severin, W. Seilmeier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 134 (1967) 230.
- [40] J. E. Hodge, B. E. Fisher, E. C. Nelson, *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 1963, 84.
- [41] G. A. M. van den Ouweland, H. G. Peer, *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 501.
- [42] A. O. Pittet, P. Rittersbacher, R. Muralidhara, *J. Agric. Food Chem.* 18 (1970) 929.
- [43] a) J. O. Rodin, C. M. Himel, R. M. Silverstein, R. W. Leeper, W. A. Gortner, *J. Food Sci.* 30 (1965) 280; b) B. Willhalm, M. Stoll, A. F. Thomas, *Chem. Ind. (London)* 1965 1629.
- [44] a) T. Severin, W. Seilmeier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 137 (1968) 4; b) F. D. Mills, D. Weisleder, J. E. Hodge, *Tetrahedron Lett.* 1970, 1243.
- [45] a) F. Ledl, W. Schnell, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 160 (1976) 367; b) F. Ledl, *Lebensmittelchem. Gerichth. Chem.* 41 (1987) 83.
- [46] a) F. D. Mills, B. G. Baker, J. E. Hodge, *Carbohydr. Res.* 15 (1970) 205; b) H. Simon, G. Heubach, *Chem. Ber.* 98 (1965) 3703; c) F. Ledl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 169 (1979) 173.
- [47] F. Ledl, G. Ellrich, H. Kostermeier, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 182 (1986) 12.
- [48] H. Matsuura, Y. Yoshida, K. Kumihira, T. Fuwa, R. Kasai, O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* 32 (1984) 4674.
- [49] J. E. Hodge, E. C. Nelson, *Cereal. Chem.* 38 (1961) 207.
- [50] J. Rothmoser, *Dissertation*, Universität München 1981.
- [51] a) J. Brand, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 37 (1894) 807; b) S. Patton, *J. Biol. Chem.* 184 (1950) 131.
- [52] J. C. Goodwin, *Carbohydr. Res.* 115 (1983) 281.
- [53] F. Weygand, H. Simon, W. Bitterlich, J. E. Hodge, B. E. Fisher, *Tetrahedron* 6 (1958) 123.
- [54] F. Ledl, G. Fritsch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 178 (1984) 41.
- [55] F. Ledl, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 179 (1984) 381.
- [56] T. Severin, A. Loidl, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 161 (1976) 119.
- [57] F. Ledl, H. Osiander, O. Pachmayr, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188 (1989) 207.
- [58] G. J. Kontoghiorghes, R. W. Evans, *FEBS Lett.* 189 (1985) 141.
- [59] W. O. Nelson, S. J. Rettig, C. Orvig, *J. Am. Chem. Soc.* 109 (1987) 4121.
- [60] H. G. Peer, G. A. M. van den Ouweland, C. N. De Groot, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* 87 (1968) 1011.
- [61] T. Doornbos, G. A. M. van den Ouweland, S. B. Tjan in [7c], S. 57.
- [62] F. Ledl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 167 (1978) 410.
- [63] R. E. Miller, S. M. Cantor, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 5236.
- [64] a) K. Heyns, J. Heukeshoven, K. H. Brose, *Angew. Chem.* 80 (1968) 62; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 7 (1968) 628; b) P. A. Finot, J. Bricont, R. Viani, J. Mauron, *Experientia* 24 (1968) 1097; c) H. Erbersdobler, H. Zucker, *Milchwissenschaft* 21 (1966) 564.
- [65] a) B. Huber, F. Ledl, T. Severin, A. Stangl, G. Pfeleiderer, *Carbohydr. Res.* 182 (1988) 301; b) F. G. Njoroge, A. A. Fernandes, V. M. Monnier, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 10646.
- [66] G. Westphal, L. Kroh, E. Sandner, *Nahrung* 25 (1981) 893.
- [67] T. Hayashi, M. Namiki in [7g], S. 29.
- [68] a) F. Hayase, H. Kato in [7g], S. 39; b) T. Severin, J. Hiebl, H. Popp-Ginsbach, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 178 (1984) 284.
- [69] a) G. Manninger, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 161 (1976) 45; b) K. Heyns, U. Sage, H. Paulsen, *Carbohydr. Res.* 2 (1966) 328; c) M. Piloty, W. Baltes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168 (1979) 374; d) T. Severin, T. Wieland, *ibid.* 153 (1973) 201; e) N. van Chuyen, T. Kurata, M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 1613.
- [70] a) M. Namiki, T. Hayashi in [7c], S. 81; b) in [7d], S. 21; c) T. Hayashi, S. Mase, M. Namiki, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 3131.
- [71] a) T. Hayashi, S. Mase, M. Namiki, *Agric. Biol. Chem.* 50 (1986) 1959; b) T. Hayashi, M. Namiki in [7g], S. 29.

- [72] Y. Kato, T. Matsuda, N. Kato, K. Watanabe, R. Nakamura, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 351.
- [73] Y. Kato, T. Matsuda, N. Kato, R. Nakamura, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 806.
- [74] M. Sengl, F. Ledl, T. Severin, unveröffentlicht.
- [75] F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 467.
- [76] M. F. Aly, R. Grigg, *Tetrahedron* 23 (1988) 7271.
- [77] a) M. U. Ahmed, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 4889; b) J. A. Dunn, D. G. Dyer, K. J. Knecht, S. R. Thorpe, D. R. McCance, K. Bailie, G. Silvestri, T. J. Lyons, J. W. Baynes in [7k], S. 425.
- [78] R. Liardon, D. de Weck-Gaudard, G. Philipposian, P. A. Finot, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 427.
- [79] A. Schönberg, R. Moubacher, *Chem. Rev.* 50 (1952) 261.
- [80] R. Miller, K. Olsson, P. A. Pernemalm, *Acta Chem. Scand. Ser. B* 38 (1984) 689.
- [81] a) A. F. Gluron, B. Quack, T. P. Mawhinney, M. S. Feather, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 677; b) W. Baltes, L. Mevissen, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 187 (1988) 209.
- [82] M. P. Piloty, W. Baltes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168 (1979) 368, 374.
- [83] P. E. Shaw, R. E. Berry, *J. Agric. Food Chem.* 25 (1977) 641.
- [84] T. Nyhammar, K. Olsson, P. A. Pernemalm, *Acta Scand. Chem. Ser. B* 37 (1983) 879.
- [85] M. Namiki, A. Terao, S. Ueda, T. Hayashi, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1986) 3139.
- [86] a) H. K. Nielsen, D. De Weck, P. A. Finot, R. Liardon, R. F. Hurrell, *Br. J. Nutr.* 53 (1985) 281; b) F. Hayase, H. Kato, M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.* 43 (1979) 2459.
- [87] S. Nakasuka, B. Feng, T. Goto, K. Kihara, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 3399.
- [88] a) T. Severin, B. Heidenhain, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 132 (1966) 65; b) T. Severin, K. H. Bräutigam, *Chem. Ber.* 106 (1973) 2943; c) K. H. Bräutigam, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 154 (1974) 80; d) E. Knoch, W. Baltes, *Lebensmittelchem. Gerichl. Chem.* 42 (1988) 110; e) T. R. Bosin, S. Krogh, D. Mais, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 843.
- [89] T. Nyhammar, P. A. Pernemalm, *Food Chem.* 17 (1985) 289.
- [90] a) T. Sugimura, T. Kawachi, M. Gajao, T. Gakagi, Y. Seino, T. Okamoto, K. Shodo, T. Kosuge, K. Tsuji, K. Watabayashi, Y. Iitaka, A. Itai, *Proc. Jpn. Acad.* 53 (1977) 58; b) M. Nagao, S. Sato, T. Sugimura in [7d], S. 521.
- [91] Z. Yamaizumi, T. Shiomi, H. Kasai, S. Nishimura, Y. Takahashi, M. Nagao, T. Sugimura, *Cancer Lett. (Shannon Irel.)* 9 (1980) 75.
- [92] a) H. Shigematsu, S. Shibata, T. Kurata, H. Kato, M. Fujimaki, *J. Agric. Food Chem.* 23 (1975) 233; b) R. Tressl, B. Helak, H. Kamperschröer, N. Martin, D. Rewicki, *ibid.* 33 (1985) 919; c) B. Helak, E. Kersten, K. Sprengler, R. Tressl, D. Rewicki, *ibid.* 33 (1985) 919; c) *ibid.* 37 (1989) 405.
- [93] a) R. Tressl, D. Rewicki, H. Kamperschröer, B. Helak, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 924; b) B. Helak, K. Sprengler, R. Tressl, D. Rewicki, *ibid.* 37 (1989) 400.
- [94] a) R. Tressl, B. Helak, K. Sprengler, A. Schröder, D. Rewicki, *Liebigs Ann. Chem.* 1985 2017; b) R. Tressl, B. Helak, D. Rewicki, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 1132; c) H. M. E. Pabst, F. Ledl, H.-D. Belitz, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 181 (1985) 386.
- [95] a) R. Tressl, K. G. Grünwald, E. Kersten, D. Rewicki, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 347; b) *ibid.* 33 (1985) 1137.
- [96] a) R. A. Wilson, I. Katz, *Flavour Ind.* 1974, 30; b) G. MacLeod in G. G. Birch, M. G. Lindley (Hrsg.): *Developments in Food Flavours*, Elsevier Applied Science, London 1986, S. 191; c) M. J. Lane, H. E. Nursten in [7d], S. 285.
- [97] a) E. J. Mulders, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 152 (1973) 193; b) F. Ledl, T. Severin, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 2 (1973) 155; c) F. Ledl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 154 (1974) 29.
- [98] a) O. G. Vitzthum, P. Werkhoff, *J. Food Sci.* 39 (1974) 1210; b) R. Tressl in [7j], S. 285.
- [99] R. A. Wilson, C. J. Mussinan, I. Katz, A. Sanderson, *J. Agric. Food Chem.* 21 (1973) 873.
- [100] a) R. K. Cho, A. Okitani, H. Kato in [7g], S. 439; b) D. B. Shin, F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* 52 (1988) 1451.
- [101] D. R. Sell, V. M. Monnier, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21597.
- [102] K. Heyns, H. Noack, *Chem. Ber.* 95 (1962) 720.
- [103] E. Klein, B. Kramhöller, F. Ledl, T. Severin, unveröffentlicht.
- [104] T. Nyhammar, S. Grivas, K. Olsson, M. Jägerstad in [7g], S. 323.
- [105] D. Yosida, Y. Saito, G. Mizugaki, *Agric. Biol. Chem.* 48 (1984) 241.
- [106] a) H. Kasai, Z. Yamaizumi, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Yokoyama, T. Miyazawa, S. Nishimura, *Chem. Lett.* 1980, 1391; b) H. Kasai, Z. Yamaizumi, T. Shimoi, S. Yokoyama, T. Miyazawa, K. Wakabayashi, M. Nagao, T. Sugimura, S. Nishimura, *ibid.* 1981 485; c) K. Wakabayashi, M. Takahashi, M. Nagao, S. Sato, N. Kinae, I. Tomita, T. Sugimura in [7g], S. 363.
- [107] R. C. Jones, J. H. Weisburger, *Mutat. Res.* 206 (1988) 343; b) *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 79 (1988) 222.
- [108] K. Aso, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* 16 (1939) 249.
- [109] a) H. Tsuchida, M. Komoto, K. Kato, M. Fujimaki, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 2571; b) H. Tsuchida, K. Morinaka, S. Fujii, M. Komoto, S. Mizuno in [7g], S. 85; c) H. Tsuchida, S. Tachibana, M. Komoto, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 1241; d) M. Komoto, H. Tsuchida, *ibid.* 44 (1980) 1189.
- [110] a) U. Kröplien, J. Rosdorfer, J. Van der Greef, R. C. Long, J. H. Goldstein, *J. Org. Chem.* 50 (1985) 1131; b) S. Fujii, H. Tsuchida, M. Komoto, *Agric. Biol. Chem.* 30 (1966) 73.
- [111] H. Tsuchida, K. Kitamura, M. Komoto, *Carbohydr. Res.* 67 (1978) 549.
- [112] W. Seibel, J. M. Brümmer, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 83 (1987) 171.
- [113] a) K. Nishie, A. C. Weiss, A. C. Keyl, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14 (1969) 301; b) I. F. Gaunt, A. G. Lloyd, P. Grasso, S. D. Gangolli, K. R. Butterworth, *Food Cosmet. Toxicol.* 15 (1977) 509.
- [114] a) J. F. Lawrence, C. F. Charbonneau, *J. Chromatogr.* 407 (1987) 405; b) U. Kröplien, *ibid.* 362 (1986) 286.
- [115] a) R. Kuhn, G. Krüger, H. J. Haas, A. Seliger, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 644 (1961) 122; b) G. Candiano, G. M. Ghiggeri, R. Gusmano, L. Zetta, E. Benfenati, G. Icardi, *Carbohydr. Res.* 184 (1988) 67.
- [116] a) H. Motai, S. Inoue, *Agric. Biol. Chem.* 38 (1974) 233; b) S. Homma, T. Tomura, M. Fujimaki, *ibid.* 46 (1982) 1791.
- [117] K. Olsson, P. A. Pernemalm, O. Theander in [7c], S. 47.
- [118] a) H. Kato, S. B. Kim, F. Hayase in [7g], S. 215; b) M. S. Feather, R. D. Huang in [7g], S. 183; c) L. M. Benzing-Purdie, C. I. Ratcliffe in [7g], S. 193; d) R. D. Huang, M. S. Feather, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 673.
- [119] a) S. B. Kim, F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* 49 (1985) 785; b) F. Hayase, S. B. Kim, H. Kato, *ibid.* 48 (1984) 2711.
- [120] a) F. Hayase, H. Kato, *Agric. Biol. Chem.* 45 (1981) 2559; b) F. Hayase, M. Sato, H. Tsuchida, H. Kato, *ibid.* 46 (1982) 2987; c) H. Tsuchida, M. Komoto, H. Kato, M. Fujimaki, *ibid.* 40 (1976) 2051; d) K. Heyns, R. Hauber, *Justus Liebig's Ann. Chem.* 733 (1970) 159; e) W. Baltes, K. Franke, W. Hörtig, R. Otto, U. Lessig in [7c], S. 137; f) H. Kato, H. Tsuchida in [7c], S. 147.
- [121] a) R. Hardt, W. Baltes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 185 (1987) 275; b) A. Dross, R. Hardt, W. Baltes, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 328 (1987) 495.
- [122] C. H. Wu, G. Russel, W. D. Powrie, *J. Food. Sci.* 52 (1987) 813.
- [123] M. Hermann, F. Ledl, unveröffentlicht.
- [124] a) S. Fors in [7d], S. 185; b) G. Ohloff, I. Flament, *Heterocycles* 11 (1978) 663; c) W. Baltes, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 75 (1979) 2; d) H. E. Nursten, *Food Chem.* 6 (1981) 263; e) J. P. Danehy, *Adv. Food Res.* 30 (1986) 77.
- [125] H. W. Brinkman, H. Copier, J. J. M. de Leuw, S. B. Tjan, *J. Agric. Food Chem.* 20 (1972) 177.
- [126] U. Gasser, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 186 (1988) 489.
- [127] a) P. Schieberle, W. Grosch, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 177 (1983) 173; *ibid.* 178 (1984) 479; *ibid.* 180 (1985) 474; b) *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 252.
- [128] a) I. Flament, B. Willhalm, M. Stoll, *Helv. Chim. Acta* 50 (1967) 2233; b) R. G. Buttery, R. M. Seifert, D. G. Guadagni, L. C. Ling, *J. Agric. Food Chem.* 19 (1971) 969; c) C. A. Pittet, D. Hruza, *ibid.* 22 (1974) 264.
- [129] P. Schieberle in [7j], S. 350; in [7k], S. 187.
- [130] C. Wan-Chung, *Dissertation*, Technische Universität München 1979.
- [131] a) H. M. E. Pabst, F. Ledl, H.-D. Belitz, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 178 (1984) 356; b) H. M. E. Pabst, H. Lotter, H.-D. Belitz, *ibid.* 186 (1988) 311.
- [132] W. Baltes, G. Bochmann, *J. Agric. Food Chem.* 35 (1987) 340.
- [133] F. Ledl, J. Hiebl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 177 (1983) 353.
- [134] F. Ledl, H. Lotter, unveröffentlicht.
- [135] F. Ledl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175 (1982) 262.
- [136] a) T. Severin, U. Krönig, *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 1 (1972) 153; b) U. Krönig, T. Severin, *ibid.* 2 (1973) 49; c) H. E. Nursten, R. O'Reilly in [7d], S. 103.
- [137] H. Hashiba in [7g], S. 155.
- [138] a) T. Kurata, M. Fujimaki, Y. Sakurai, *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 1471; b) T. Hayashi, Y. Hoshi, M. Namiki, *ibid.* 47 (1983) 1003; *ibid.* 48 (1984) 2377; c) T. Kurata, T. Imai, N. Arakawa in [7g], S. 67.
- [139] H. Sakurai, K. Ishii, *Bull. Coll. Agric. Vet. Med. Nihon Univ.* 45 (1988) 50, 59.
- [140] B. Huber, P. Noll, F. Ledl, unveröffentlicht.
- [141] H. Pehr, G. Manninger, T. Severin, *Carbohydr. Res.* 64 (1978) 1.
- [142] L. Mevissen, W. Baltes, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176 (1983) 206.
- [143] P. Noll, F. Ledl, unveröffentlicht.
- [144] P. E. Shaw, J. H. Tatum, R. E. Berry, *Carbohydr. Res.* 16 (1971) 207.
- [145] F. Ledl, G. Fritsch, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 175 (1982) 208.
- [146] F. D. Mills, J. E. Hodge, W. K. Rohwedder, L. W. Tjarks, *J. Org. Chem.* 38 (1973) 2512.
- [147] J. E. Hodge, C. D. Evans, US-Pat. 2 806/794 (1957).
- [148] R. Schnee, K. Eichner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 185 (1987) 188.
- [149] F. Ledl, G. Fritsch, J. Hiebl, T. Severin, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 176 (1983) 294.
- [150] a) H. Lingnert, C. E. Eriksson in [7d], S. 335; b) N. Yamaguchi in [7g], S. 291.
- [151] B. Commoner, A. J. Vitayathil, P. Dolara, G. Nair, P. Madyastha, G. C. Cuca, *Science (Washington D. C.)* 201 (1978) 913.
- [152] M. Scheutwinkel-Reich, G. Reese, W. van der Hude, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 180 (1985) 207.

- [153] a) M. Jägerstadt, A. L. Reuterswärd, R. Öste, M. Dahlquist in [7d], S. 507; b) K. Shinohara, R. T. Wu, N. Jahan, M. Tanaka, N. Moringa, H. Murakami, H. Omura, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 671.
- [154] a) H. Ohgaki, K. Kusama, N. Matsukura, K. Marino, H. Hasegawa, S. Sato, S. Takayama, T. Sugimura, *Carcinogenesis (London)* 5 (1984) 921; b) H. Ohgaki, H. Hasegawa, T. Kato, M. Suenaga, M. Ubutaka, S. Sato, S. Takayama, T. Sugimura, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 61 (1985) 137; c) T. Sugimura, S. Takayama, H. Ohgaki, K. Wakabayashi, M. Nagao in [7k], S. 323.
- [155] a) S. B. Kim, F. Hayase, H. Kato in [7g], S. 383; b) T. Kada, K. Morita, T. Inone, *Mutat. Res.* 53 (1978) 351; c) R. I. M. Chan, H. F. Stich, M. P. Rosin, W. D. Powrie, *Cancer Lett. (Shannon Irel.)* 15 (1982) 27.
- [156] a) D. W. Gruenwedel, S. C. Lynch, G. F. Russel, *Adv. Exp. Med. Biol.* 177 (1984) 269; b) K. Heyns, S. Röper, H. Röper, B. Meyer, *Angew. Chem.* 91 (1979) 940; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18 (1979) 878.
- [157] N. Kinae in [7g], S. 343.
- [158] S. Mihara, T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem.* 28 (1980) 62.
- [159] A. Nagahara, K. Ohshita, S. Nasuno in [7g], S. 373.
- [160] H. U. Aeschbacher in [7k], S. 335.
- [161] a) H. Omura, N. Jahan, K. Shimohara, H. Murakami in [7d], S. 537; b) M. Nagao, T. Yahagi, M. Honda, Y. Seino, T. Matsushima, T. Sugimura, *Proc. Jpn. Acad.* 53 (1977) 34.
- [162] a) J. Mauron, F. Mottu, *Arch. Biochem. Biophys.* 77 (1958) 312; b) P. A. Finot, J. Mauron, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 1488; c) J. Mauron, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 40 (1970) 209; d) P. A. Finot, E. Magnenat, F. Mottu, E. Bujard, *Ann. Nutr. Aliment.* 32 (1978) 325; e) B. Sherr, C. M. Lee, C. Jelesiewicz, *J. Agric. Food Chem.* 37 (1989) 119.
- [163] a) D. E. Furniss, R. F. Hurrell, P. A. Finot, *Acta Pharmacol. Toxicol.* 59 (1986) 188; b) R. F. Hurrell in [7k], S. 245.
- [164] P. A. Finot, D. E. Furniss in [7i], S. 343.
- [165] M. Fujimaki, S. Homma, N. Arakawa, C. Inagaki, *Agric. Biol. Chem.* 43 (1979) 497.
- [166] G. J. Pintauro, T. C. Lee, C. O. Chichester in [7d], S. 467.
- [167] a) H. S. Burton, D. J. McWeeny, D. O. Biltcliffe, *J. Sci. Food Agric.* 14 (1963) 911; b) B. L. Wedzicha (Hrsg.): *Chemistry of Sulfur Dioxide in Foods*, Elsevier Applied Science, London 1984.
- [168] H. E. Nursten in D. MacCarthy (Hrsg.): *Concentration and Drying of Foods*, Elsevier Applied Science, London 1986, S. 53.
- [169] a) M. E. Knowles, *Chem. Ind.* 1971, 910; B. Lindberg, J. Tanaka, O. Theander, *Acta Chem. Scand.* 18 (1964) 1164; E. F. L. J. Anet, D. L. Ingles, *Chem. Ind.* 1964, 1319; b) B. L. Wedzicha, M. T. Kaputo, *J. Food Sci. Technol.* 22 (1987) 643.
- [170] a) R. G. Arnold, *J. Dairy Sci.* 52 (1969) 1857; b) L. Kroh, S. Zeise, G. Westphal, R. Macholz, *Nahrung* 33 (1989) 51; c) L. Kroh, S. Zeise, R. Stösser, G. Westphal, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 188 (1989) 115.
- [171] D. W. Allen, W. A. Schroeder, J. Balog, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1628.
- [172] a) H. F. Bunn, R. Shapiro, M. McManns, L. Garrick, M. J. McDonald, P. M. Gallop, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 3892; b) A. L. Trivelli, H. M. Ranney, H. T. Lai, *N. Engl. J. Med.* 284 (1971) 353; siehe auch [174].
- [173] S. Rahbar, O. Blumenfeld, H. M. Ranney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36 (1969) 838.
- [174] H. F. Bunn, D. N. Haney, K. H. Gabbay, P. M. Gallop, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67 (1975) 103.
- [175] a) R. Flückiger, K. H. Winterhalter, *FEBS Lett.* 71 (1976) 356; b) R. Dolhofer, A. Städele, O. H. Wieland, *Klin. Wochenschr.* 55 (1977) 945.
- [176] a) J. W. Baynes, S. R. Thorpe, M. M. Murtiashaw, *Methods Enzymol.* 106 (1984) 88; b) E. Schleicher, O. H. Wieland, *Biochim. Biophys. Acta* 884 (1986) 199.
- [177] H. E. Schultz, J. F. Heremans (Hrsg.): *Molecular Biology of Human Proteins*, Elsevier, Amsterdam 1966, S. 473.
- [178] Ein Glucoprotein aus *Halobacterium halobium* wurde beschrieben, das Glucose N-glycosidisch am Amidstickstoffatom des Asparagins gebunden enthält: F. Wieland, R. Heitzer, W. Schäfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 5470.
- [179] In gewissem Umfang reagiert die Fructose mit Proteinen in vivo auch zur 2-Amino-2-desoxyglucose 2 (Heyns-Produkt): J. D. McPherson, B. H. Shilton, D. J. Walton, *Biochemistry* 27 (1988) 1901.
- [180] C. I. Neglia, H. J. Cohen, A. R. Garber, P. D. Ellis, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14279.
- [181] E. Schleicher, O. H. Wieland, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19 (1981) 81.
- [182] O. H. Wieland, R. Dolhofer, E. Schleicher, *Int. Congr. Ser. Excerpta Med. n* 500 (1980) 721.
- [183] a) R. Dolhofer, O. H. Wieland, *Diabetes* 29 (1980) 417; b) *Clin. Chim. Acta* 112 (1981) 197.
- [184] R. N. Johnson, P. A. Metcalf, J. R. Baker, *Clin. Chim. Acta* 127 (1983) 87.
- [185] a) R. Flückiger, P. M. Gallop, *Methods Enzymol.* 106 (1984) 77; b) K. Miedema, T. Casparie, *Ann. Clin. Biochem.* 21 (1984); c) E. Schleicher, *Internist* 26 (1985) 372.
- [186] R. W. Fischer, K. H. Winterhalter, *FEBS Lett.* 135 (1981) 145.
- [187] L. K. Curtiss, J. L. Witztum, *J. Clin. Invest.* 72 (1983) 1427.
- [188] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, *Diabetes* 29 (1980) 1044.
- [189] E. Schleicher, R. Mayer, unveröffentlicht.
- [190] a) J. F. Day, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 595; b) R. Dolhofer, O. H. Wieland, *FEBS Lett.* 103 (1979) 282.
- [191] a) M. Cohen (Hrsg.): *Diabetes and Protein Glycosylation*, Springer, Berlin 1986; b) E. D. Schleicher, T. Deufel, O. H. Wieland, *FEBS Lett.* 129 (1981) 1; c) E. D. Schleicher, K. D. Gerbitz, R. Dolhofer, E. Reindl, O. H. Wieland, E. Edelmann, M. Haslbeck, W. Kemmler, H. Walter, H. Mehnert, *Diabetes Care* 7 (1984) 548.
- [192] E. Schleicher, R. Scheller, O. H. Wieland, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 (1981) 1011.
- [193] B. W. Vogt, E. D. Schleicher, O. H. Wieland, *Diabetes* 31 (1982) 1123.
- [194] S. L. Schneider, R. R. Kohn, *J. Clin. Invest.* 67 (1981) 1630.
- [195] R. L. Garlick, H. F. Bunn, R. Spiro, *Diabetes* 37 (1988) 1144.
- [196] E. Reindl, *Dissertation*, Universität München 1983.
- [197] V. M. Monnier, R. R. Kohn, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 583.
- [198] S. Pongor, P. C. Ulrich, F. A. Bencsath, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 2684.
- [199] T. J. Lyons, G. Silvestri, J. A. Dunn, J. W. Baynes, Conference on „Glycated Proteins in Diabetes mellitus“, Adelaide, Australien 1988.
- [200] A. Cerami, H. Vlassara, M. Brownlee, *Diabetes Care* 11 Suppl. 1 (1988) 73.
- [201] R. Bucala, P. Model, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 105.
- [202] V. J. Stevens, C. A. Rouzer, V. A. Monnier, A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2918.
- [203] a) S. L. Chiu, L. T. Chylack, H. F. Bunn, J. H. Kinoshita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980) 894; b) V. M. Monnier, A. Cerami, *Science (Washington D. C.)* 211 (1981) 491.
- [204] a) D. E. Harrison, J. R. Archer, *Exp. Gerontol.* 13 (1978) 75; b) M. J. C. Kent, N. D. Light, A. J. Bailey, *Biochem. J.* 225 (1985) 745.
- [205] A. S. Eble, S. R. Thorpe, J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 9406.
- [206] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, *Diabetes* 34 (1985) 938.
- [207] H. Vlassara, M. Brownlee, A. Cerami, *Clin. Chem. (Winston-Salem N. C.)* 32 (1986) 37.
- [208] R. Dolhofer, E. A. Siess, O. H. Wieland, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 363 (1982) 1427.
- [209] a) M. Brownlee, H. Vlassara, A. Cerami, *Diabetes* 32 (1983) 680; b) *Diabetologia* 33 (1984) 532.
- [210] R. Dolhofer, O. H. Wieland, *FEBS Lett.* 100 (1979) 133.
- [211] a) J. L. Witztum, E. H. Mahoney, M. J. Branks, M. Fisher, R. Elam, D. Steinberg, *Diabetes* 31 (1982) 283; b) E. D. Schleicher, B. Olgemöller, J. Schön, T. Dürst, O. H. Wieland, *Biochim. Biophys. Acta* 846 (1985) 226.
- [212] H. Vlassara, H. Brownlee, A. Cerami, *J. Exp. Med.* 160 (1984) 197.
- [213] a) M. Oimoni, H. Hatanaka, K. Ishikawa, S. Kubota, Y. Yoshimura, S. Baba, *Klin. Wochenschr.* 62 (1984) 477; b) M. Oimoni, S. Nishimoto, T. Kitamura, S. Matsumoto, H. Hatanaka, K. Ishikawa, S. Baba, *ibid.* 63 (1985) 728.
- [214] V. M. Monnier, V. Vishwanath, K. F. Frank, A. E. Graig, P. Dauchot, R. R. Kohn, *N. Eng. J. Med.* 314 (1986) 403.
- [215] M. Brownlee, H. Vlassara, A. Kooney, P. Ulrich, A. Cerami, *Science (Washington D. C.)* 232 (1986) 1629.
- [216] M. Wißfeld, P. Noll, F. Ledl, unveröffentlicht.