

## N.M.R. UNTERSUCHUNGEN UND ANALYTIK VON N-(1-DESOXY-D-FRUCTOS-1-YL)-N-NITROSO-L-AMINOSÄUREN ("N-NITROSO-FRUCTOSEAMINOSÄUREN")\*

HARALD RÖPER

*CPC Europe Industrial Products, Research and Development Center, Havenstraat 84, B-1800 Vilvoorde (Belgium)*

(Eingegangen am 22. September 1986; angenommen in revidierter Form am 23. Februar 1987)

### ABSTRACT

Thirteen *N*-(1-deoxy-D-fructos-1-yl)-*N*-nitroso-L-amino acids were prepared, in 83–95% yield, by nitrosation of the corresponding "fructose-amino acids" with sodium nitrite in water-hydrochloric acid, at pH 3. The <sup>1</sup>H-n.m.r. spectra were complicated by the presence of different sugar-ring forms ( $\alpha$ , $\beta$ -furanoses and -pyranoses). In addition, signal doubling for all proton resonances were observed for the *E/Z* isomer *N*-nitroso compounds. Signals of  $\beta$ -D-pyranoses unequivocally can be assigned as >50% in solution equilibrium. In D<sub>2</sub>O, some compounds showed a slow H-D-exchange for H-1a and H-1b. Ring conformation for all *E/Z* isomer  $\beta$ -pyranoses was <sup>2</sup>C<sub>5</sub>(D). The <sup>13</sup>C-n.m.r.-spectra exhibited resonances of all four ring-forms, with signal doubling for *E/Z* isomers, all of which could be assigned. Signals of open chain-forms were not present. For the  $\beta$ -D-pyranose forms, changes of chemical shifts, caused by *N*-nitrosation, were calculated by comparison with the educts ( $\Delta\delta$  values) and separately discussed for *E*- and *Z*-isomers. The separation by reversed-phase, ion-pairing, l.c., and the pKa values of the nitroso derivatives are reported, as well as the e.i.–mass spectra of their per(trimethylsilyl) derivatives.

### ZUSAMMENFASSUNG

Dreizehn *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-*N*-nitroso-L-aminosäuren werden durch Nitrosierung der entsprechenden *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-aminosäuren ("Fructoseaminosäuren") mit Natriumnitrit in wässrig salzsaurer Lösung (pH 3) mit 83–95% Ausbeute hergestellt. Die <sup>1</sup>H-N.m.r. Spektren sind durch das

\*Herrn Prof. Dr. B. Helferich anlässlich seines hundersten Geburtstages gewidmet. Biologisch aktive Derivate von Aminozuckern. Auszug aus der Habilitationsschrift von H. Röper "Organische Umweltkarzinogene. Spurenanalyse und Entstehung von *N*-Nitroso-Verbindungen", Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, 1983.

Vorliegen verschiedener Zuckerringformen ( $\alpha,\beta$ -Furanosen und -Pyranosen) sehr komplex. Zusätzlich treten für alle Protonenresonanzen Signalverdopplungen durch E/Z isomere N-Nitroso-Verbindungen auf. Die Signale der  $\beta$ -D-Pyranosen, deren Anteil im Lösungsgleichgewicht >50% ist, können eindeutig zugeordnet werden. Für die H-1a und H-1b Protonen wird bei einigen Verbindungen langsamer H-D-Austausch in D<sub>2</sub>O beobachtet. Die Ringkonformation für alle E/Z-isomeren  $\beta$ -D-Pyranosen ist <sup>2</sup>C<sub>5</sub>(D). Die <sup>13</sup>C-N.m.r. Spektren zeigen Resonanzen aller vier Ringformen mit Signalverdopplungen durch E/Z-Isomere, die alle zugeordnet werden können. Signale offenkettiger Formen sind nicht vorhanden. Für die  $\beta$ -D-Pyranose Formen der E- und Z-Isomeren werden Änderungen in den chemischen Verschiebungen durch die N-Nitrosierung im Vergleich zu den Edukten ermittelt ( $\Delta\delta$ -Werte) und diskutiert. Die Umkehrphasen-Ionenpaar-l.c.-Trennung, die pKa Werte und die e.i.-Massenspektren der Per(trimethylsilyl)-Derivate werden mitgeteilt.

#### EINLEITUNG

Im Verlauf der Maillard-Reaktion<sup>1-11</sup>, reagieren reduzierende Zucker mit Aminkomponenten (Amine, Aminosäuren, Peptide und Proteine) in einer komplexen Reaktion unter Bildung niedermolekularer, flüchtiger Substanzen und hochmolekularer, nicht flüchtiger brauner Verbindungen (Melanoidine). Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle in der Lebensmitteltechnologie, aber auch bei der Zubereitung von Nahrung durch Kochen, Braten, Backen und Rösten im Haushalt. Sie ist teils erwünscht, z.B. wegen der Bildung niedermolekularer Aromastoffe, teils unerwünscht, z.B. wegen des Verlustes physiologisch essentieller Aminosäuren, wie Lysin<sup>12,13</sup>.

Bei der Reaktion von D-Glucose mit L-Aminosäuren entstehen N-substituierte Glucosylaminderivate, die unter Amadori-Umlagerung<sup>14,15</sup> zu N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-aminoäuren ("Fructoseaminoäuren")<sup>16</sup>, den Schlüsselsubstanzen der Maillard-Reaktion, abreagieren<sup>17</sup>. Die Darstellung kristalliner aromatischer Glycosylamine durch Helferich und Mitrowsky<sup>18</sup> kann als wichtiger Beitrag zur Klärung des Mechanismus dieser Reaktion gewertet werden. Fructoseaminoäuren wurden in verschiedenen Hitze behandelten Nahrungsmitteln<sup>19,20</sup> sowie in Schweine- und Kalbsleberextrakten<sup>21,22</sup> nachgewiesen (Lit. Übersicht<sup>23</sup>).

Bei eigenen Untersuchungen im Rahmen der Nitrosamin-Problematik<sup>24,25</sup> konnte gezeigt werden, daß derartige Aminozuckerderivate mit sekundärer Aminogruppe stabile N-Nitrosoverbindungen bilden<sup>26-28</sup>. Mutagenitäts-Tests nach Ames waren bei einigen N-Nitroso-D-Fructoseaminoäuren positiv<sup>23,28-30</sup>. Damit stellt sich die Frage, ob und in welchen Konzentrationen diese "neuartigen" Nitrosamine in Nitrit (Nitrat) haltigen Maillard-Systemen, wie z.B. gepökeltem Fleisch, gesalzenem Fisch, Käse oder Tabak vorkommen (exogene Nitrosamin Bildung).

Außerdem sind Zuckeraminoäuren in Lebensmitteln ein Substanzpotential für eine endogene Bildung von möglicherweise karzinogenen N-Nitroso-Zucker-

TABELLE I  
<sup>1</sup>H-NMR-CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN\* ( $\delta$ ) DER E/Z-ISOMEREN VON 1-8

Atom	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8b</b>		
	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	
H-1-a	4.19 (d)	3.94 (d)	c	c	c	c	4.36	4.26	3.90	4.19	3.90	4.43	3.90	4.34	c	4.48	
H-1-b	4.65 (d)	3.96 (d)	c	c	4.57	4.40	4.32	3.98	4.25	4.13	4.52	4.00	4.57	4.06	4.57	4.07	
H-3	3.62 (d)	3.38 (d)	3.60	3.36	3.62	3.22	3.62	3.32	3.58	3.27	3.65	3.34	3.64	3.22	3.70	3.42	
H-4	3.81 (dd)	3.71 (dd)	3.78	3.67	3.77	3.67	d	3.68	3.79	3.64	3.80	3.61	3.78	d	3.87	3.75	
H-5	3.88 (m)	3.65	3.73	3.87	3.75	3.75	d	3.78	3.87	3.73	3.85	3.78	3.84	d	3.85	d	
H-6a	3.53 (dd)	3.51 (dd)	3.49	3.46	d	3.49	d	3.48	3.51	3.50	3.54	3.45 (d)	3.56	3.49 (d)	3.60	3.58	
H-6b	3.83 (dd)	3.80	d	3.81	d	3.81	d	3.88 (d)	3.79	3.88	d	3.91	d	3.87	d	3.87	
H-2'a	4.70 (d)	4.56 (q)	4.86 (q)	4.19 (d)	4.24 (d)	4.71 (dd)	4.75 (dd)	4.22 (d)	4.32 (d)	4.21 (t)	5.11 (t)	4.44 (d)	4.78 (d)	d	4.71 (dd)		
H-2'b	4.26 (d)	4.85 (d)		2.34 (m)	2.48 (m)	1.23 (m)	1.38 (m)	2.01 (m)	2.15 (m)	3.98 (dd)	3.99 (dd)	4.24 (m)	d	2.84 (m)	2.84 (m)		
H-3'a						1.59 (m)	1.79 (m)										
H-3'b						1.92 (m)	2.08 (m)	1.09 (m)	1.31 (m)								
H-4'a																	
H-4'b																	
Me-3'																	
Me-4'																	
Me-5'																	
Me-6'																	

\*Für die  $\beta$ -D-Pyranose-Formen bei 360 und 400 MHz, 3-7% Lösungen in Aceton ( $\delta$  2.08) als innerem Standard. <sup>a</sup>SMe 2.04 (s). <sup>b</sup>Z 2.05 (s). E: Nicht beobachtet; H-D-Austausch. <sup>c</sup>Nicht beobachtet (überlagert).

TABELLE II

'H-N.M.R. CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN<sup>a</sup> (δ) DER E/Z ISOMEREN VON 9-13 UND 15

Atom	9		10 <sup>b</sup>		11c		12d		13		15	
	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E
H-1a	4.36	4.02	4.33	4.12	4.23	3.87	4.34	3.98	‘	‘	3.96	3.20 (s)
H-1b	4.51	4.11	4.44	4.18	4.26	4.14	‘	4.07	‘	‘	‘	‘
H-3	3.64	3.35	3.62	3.23	3.66	3.20	3.64	3.37	3.42	3.18	3.29	3.29
H-4	3.80	3.69	3.77	3.60	f	3.60	3.84	3.71	3.70	3.60	3.68	3.68
H-5	3.85	f	3.81	3.74	3.82	3.74	3.82	3.75	3.79	3.65	3.78	3.78
H-6a	3.51 (d)	f	3.51	f	3.44	3.44	3.56	3.50	3.53	3.26	3.41	3.41
H-6b	3.83 (d)	f	3.84	f	3.68	3.88 (d)	3.76 (d)	3.79	3.79	3.76	3.76	3.76
H-2'a	4.80 (m)	5.16 (m)	4.88 (dd)	5.09 (dd)	4.98 (dd)	5.06 (dd)	5.13 (dd)	4.80 (dd)	5.08 (dd)	3.86	3.86	3.86
H-3'a	2.74 (dd)	3.13 (d)	↔3.17 (m)→	f	f	3.25 (dd)	3.32 (dd)	3.21 (m)	f	f	f	f
H-3'b	3.02 (dd)					3.02 (m)						

## Indolyl

H-2	6.94 (s)	6.99 (s)	7.77 (s)
H-4	7.34 (d)	7.36 (d)	
H-5	7.08 (m)	7.09 (m)	8.00 (m)
H-6	7.00 (d)	7.02 (d)	
H-7	7.47 (d)	7.60 (d)	8.33 (d) bzw. H-4

<sup>a</sup>See Tab. I. <sup>b</sup>Phenyl: 7.18 (m) Z-Isomer; 7.02 (d) J 7.0 Hz, E-Isomer. <sup>c</sup>p-HO-Phenyl: 6.89 (d, J 8.0 Hz, H-3.5), 6.57 (d, J 8.0 Hz, H-2,6, Z-Isomer), 7.01 (d, J 8.0 Hz, H-3.5), 6.67 (d, J 8.0 Hz, H-2,6, E-Isomer); im Aromatenbereich Veränderungen durch Kernnitrosierung, ~33%, ~7.10 (s, Imidazolyl H-5, Z-Isomer, 44%), 7.14 (s, Imidazolyl H-5, E-Isomer, 56%), 7.43 (s, Imidazolyl H-2). <sup>d</sup>Nicht beobachtet: H-D-Austausch.

TABELLE III

KOPPLUNGSKONSTANTEN (Hz) VON 1-13 UND 15

<i>Kopplungsk.</i>		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>		<b>6</b>		<b>7</b>		<b>8</b>		
Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	
<i>J</i> <sub>1a,1b</sub>	-14.4	-14.4	<sup>a</sup>	-14.0	-13.6	-14.4	-14.0	-14.4	-14.0	-14.8	-14.0	-14.4	-14.4	-14.4	-14.4	-14.0	-14.0	
<i>J</i> <sub>3,4</sub>	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	
<i>J</i> <sub>4,5</sub>	3.5	3.5	3.2	3.2	3.4	3.4	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	
<i>J</i> <sub>5,6a</sub>	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	2.2	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	
<i>J</i> <sub>5,6b</sub>	1.0	<sup>b</sup>	1.0	<sup>b</sup>	1.0	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	<sup>b</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	
<i>J</i> <sub>6a,6b</sub>	-12.8	-12.8	-12.4	-12.4	<sup>b</sup>	-13.0	<sup>b</sup>	-13.0	-12.0	-12.8	-12.8	-12.6	-12.6	-12.6	-12.6	-12.6	-12.4	
<i>J</i> <sub>2,4,2'</sub>	-16.0	-16.0	7.0	7.0	9.0	9.0	5.0	8.8	5.0	8.8	8.4	8.6	6.6	8.2	8.2	7.2	7.2	
<i>J</i> <sub>2,3'</sub>							<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	3.8	3.8	?	?	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	
<i>J</i> <sub>3,4'</sub>							<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	
<i>J</i> <sub>4,4'</sub>																		
<i>J</i> <sub>4',Me'</sub>																		
<i>J</i> <sub>3',Me'</sub>																		
<i>J</i> <sub>3',Me-4'</sub>																		
<b>9</b>		<b>10</b>		<b>11</b>		<b>12</b>		<b>13</b>		<b>14</b>		<b>15</b>						
Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E	
<i>J</i> <sub>1a,1b</sub>	-14.8	-14.5	-14.7	-14.6	-14.4	-14.4	-14.0	-14.4	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	-14.0	
<i>J</i> <sub>3,4</sub>	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	9.8	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	
<i>J</i> <sub>4,5</sub>	3.4	3.4	3.4	3.4	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	
<i>J</i> <sub>5,6a</sub>	<sup>c</sup>	<sup>b</sup>	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8								
<i>J</i> <sub>5,6b</sub>	<sup>c</sup>	<sup>b</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>	<sup>c</sup>							
<i>J</i> <sub>6a,6b</sub>	-12.4	-12.4	-13.0	<sup>b</sup>	5.2/11.2	<sup>b</sup>	5.4/11.0	5.4/10.8	-12.4	-12.5	-12.5	-12.5	-12.5	-12.5	-12.5	-12.5	-12.5	
<i>J</i> <sub>2,3'</sub>	7.5	7.5	5.8/10.6	<sup>b</sup>	5.2/11.2	<sup>b</sup>	5.4/11.0	5.4/10.8	<sup>b</sup> 9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	6.0/9.0	
<i>J</i> <sub>3,4,3'</sub>	-16.5	<sup>b</sup>	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0	-16.0							
Indolyl																		
<i>J</i> <sub>4,5</sub>																8.0	8.0	
<i>J</i> <sub>5,6</sub>																7.6	7.6	
<i>J</i> <sub>6,7</sub>																7.8	7.8	

<sup>a</sup>H-D-Austausch. <sup>b</sup>Nicht beobachtet. <sup>c</sup>Nicht aufgelöst.

TABELLE IV

DIFFERENZWERTE CHEMISCHER VERSCHIEBUNGEN AUSGEWÄHLTER PROTONENRESONANZEN ZWISCHEN (1-DESOXY-D-FRUCTOS-1-YL)-L-AMINOSÄUREN<sup>b</sup> UND N-NITROSODERIVATEN IN DEN  $\beta$ -D-PYRANOSE-FORMEN

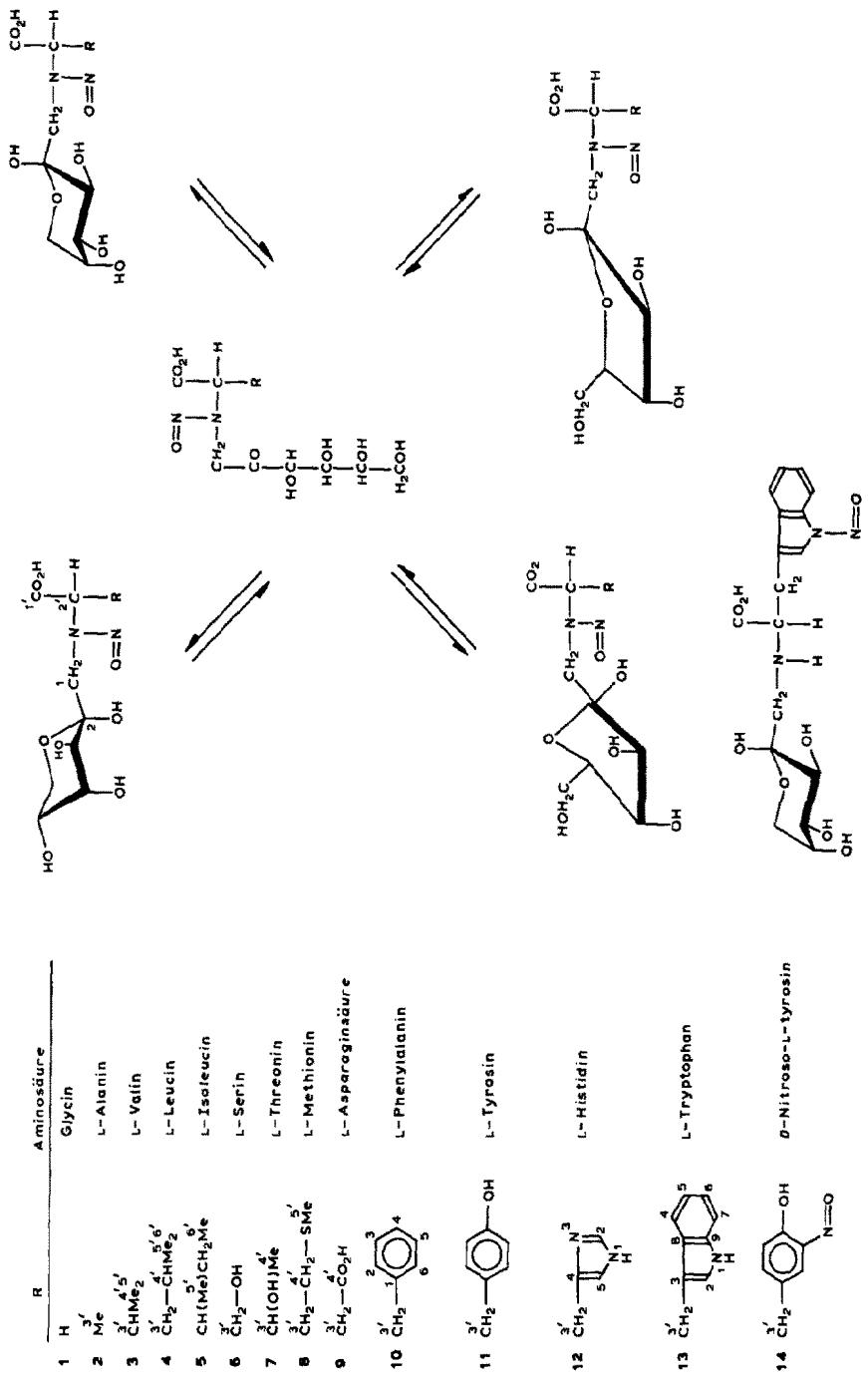
Verbindung	H-1a	H-1b	H-3	H-2'a	H-2'b
<b>1</b> Z	1.02	1.40	-0.01	-0.51	0.70
E	0.77	0.71	-0.25	1.14	1.29
<b>2</b> Z	c	c	-0.02	0.91	
E	c	c	-0.26	1.21	
<b>3</b> Z	c	1.37	0.0	0.68	
E	1.21	1.20	-0.40	0.73	
<b>4</b> Z	1.16	1.15	0.01	1.12	
E	0.80	0.81	-0.27	1.16	
<b>5</b> Z	1.01	1.02	0.01	0.70	
E	0.72	0.90	-0.30	0.80	
<b>6</b> Z	1.20	1.24	-0.01	0.46	
E	0.67	0.77	-0.32	1.36	
<b>7</b> Z	1.14	1.31	0.01	0.96	
E	c	0.80	-0.41	1.30	
<b>8</b> Z	1.29	1.38	0.08		
E	0.78	0.88	-0.20	0.99	
<b>9</b> Z	1.14	1.15	-0.02	0.84	
E	0.80	0.75	-0.31	1.20	
<b>10</b> Z	1.24	1.27	-0.1	1.01	
E	1.03	1.01	-0.34	1.22	
<b>11</b> Z	1.34	1.25	0.12	1.35	
E	0.98	1.13	-0.34	1.43	
<b>12</b> Z	1.34	c	0.05	d	
E	0.98	0.99	-0.22	1.57	
<b>13</b> Z	c	c	-0.11	0.89	
E	0.93	c	-0.35	1.17	
<b>15c</b>	0.17	0.17	-0.24	-0.05	

<sup>a</sup>Lösungen in D<sub>2</sub>O. Δδ-Werte (N-N=O minus NH) in p.p.m. <sup>b</sup>Zit. 16. <sup>c</sup>Nicht beobachtet: H-D-Austausch. <sup>d</sup>Nicht aufgelöst. <sup>e</sup>Indolyl H-2: 0.58.

aminoäuren im menschlichen Körper, z.B. in der Mundhöhle, im Magen oder im Darmtrakt aus zugeführtem oder Körper eigenem Nitrit und den mit der Nahrung aufgenommenen Zuckeraminosäuren. Ob dieser neuartigen Klasse schwer-flüchtiger bis-beta oxidierter N-Nitroso-Verbindungen bei der Entstehung von Humankrebsen eine Rolle zukommt muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Im Folgenden wird über die Darstellung, Charakterisierung, N.m.r. Spektroskopie und l.c. Methodik zur Trennung von N-Nitroso-D-Fructoseaminoäuren berichtet.

#### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-aminoäuren ("N-NO-Fruc-



Schema 1. Dargestellte *N*-(1-Desoxy-D-fructopyranos-1-yl)-*N*-nitroso-L-aminosäuren und Gleichgewichtsformen in D<sub>2</sub>O. Die wahrscheinlichen Konformationen für die E-Isomeren sind gezeichnet; nur die  $\alpha$ -C<sub>2</sub>(D)-Sesselform der  $\beta$ -D-Pyranose-Form ist durch  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektroskopie abgesichert.

TABLE V

<sup>13</sup>C-N.M.R. CHEMISCHE VERSCHIEBUNGEN ( $\delta$ )<sup>a</sup> DER E/Z-ISOMEREN VON 1-[3]

<b>7</b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	58.75	98.46	70.28	69.92	69.65	63.09	63.79	21.45
	E	Z	51.75	98.27	70.19	69.76	69.52	63.04	69.79	21.64
	$\beta$ - <i>f</i>	Z	57.69	77.38	74.60	81.30	62.46			19.87
	E	Z	50.74	101.09	77.24	74.51	81.15			19.76
	$\alpha$ - <i>f</i>	Z	50.35	103.28	83.90	76.22	82.64	61.70		18.15
	E	Z	43.22		83.34	76.16	82.30			18.04
	$\alpha$ - <i>p</i>	Z	98.99	70.97	72.00					16.93
	E	Z	43.23							19.23
<b>8<sup>b</sup></b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	57.45	97.94	69.75	69.24	69.08	63.21	174.57	63.04
	E	Z	50.45	97.32	69.54	69.08	68.98	63.04	176.96	69.24
	$\beta$ - <i>f</i>	Z	100.53		77.50	74.50	80.53	62.78		30.27
	E	Z			77.40	74.30	80.34	62.60		26.70
	$\alpha$ - <i>f</i>	Z			83.47	77.40	82.60	61.56		26.99
	E	Z			82.97	77.20	82.02	61.42		
<b>9</b>	$\alpha$ - <i>p</i>	Z	98.71	79.73	70.53	69.68	69.17	68.87	173.39	57.78
	$\beta$ - <i>p</i>	Z	57.47	97.73	69.34	69.07	68.87	63.11		33.37
	E	Z	49.52	97.80	69.48				60.51	175.99
	$\beta$ - <i>f</i>	Z			77.33	74.43	80.81	62.46		36.97
	E	Z			77.23	74.06	80.81	61.64		38.89
<b>10</b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	57.91	97.93	69.91	69.41	68.53	63.24	173.48	65.29
	E	Z	50.72	97.85	69.57	69.33	69.10	63.24	175.91	70.69
	$\beta$ - <i>f</i>	Z	57.67	100.73	77.17	74.43	80.90	62.93		37.18
	E	Z	50.32		76.62	74.20	80.67	62.93		37.92
	$\alpha$ - <i>f</i>	Z			83.87	77.56	82.62	61.96		32.96
	E	Z			83.60	77.36	82.32	61.69		
<b>11</b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	54.65		70.00	70.00	69.70	63.72		
	E	Z	57.93	97.92	69.92	69.37	69.13	63.40	173.00	50.25
	$\beta$ - <i>p</i>	Z	97.92	69.65	69.27	68.78	63.28	175.08		31.65
	E	Z			78.07	74.66	80.88	62.96		37.65
	$\beta$ - <i>f</i>	Z			77.80	74.54	80.82	62.75		23.14
	E	Z			77.40	74.33	80.63			130.25
	$\alpha$ - <i>f</i>	Z								116.00
	E	Z								131.10
<b>12</b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	54.65							142.00
	E	Z	57.80							131.10
	$\beta$ - <i>f</i>	Z								116.00
	E	Z								116.98
	$\alpha$ - <i>f</i>	Z								117.71
<b>13<sup>c</sup></b>	$\beta$ - <i>p</i>	Z	58.18	98.18	69.98	69.54	69.07	63.27	175.10	65.80
	E	Z	50.73	98.15	69.81	69.33	69.07	63.27	177.50	71.16
	$\beta$ - <i>f</i>	Z	100.90		77.40	74.67	80.97	62.60		27.53
	E	Z			77.40	74.33	80.63			

<sup>a</sup>Gemessen bei 90.52 und 100.57 MHz, 1,5–30% Lösungen in D<sub>2</sub>O; Aceton (<sup>a</sup>30.5) als innerer Standard. Nicht angegebene Resonanzen waren entweder durch überwiegende  $\beta$ -D-Pyranose-Signale oder durch andere verdeckt, oder von zu geringer Intensität, wie im Fall der quartären C-Atome. <sup>b</sup>S-Me,  $\delta$  14.06  $\beta$ -D-Pyranose-Form. <sup>c</sup>Indolyl-Resonanzen für die  $\beta$ -D-Pyranose-Form: C-2 123.99 (Z), 124.53 (E), C-3 110.60 (Z), C-4 118.66 (Z), C-5 118.76 (E), C-6 112.09 (Z), C-7 119.44 (Z), C-8 136.42 (Z), C-9 126.89 (Z).

TABELLE VI

DIFFERENZWERTE CHEMISCHER VERSCHIEBUNGEN AUSGEWÄHLTER  $^{13}\text{C}$ -RESONANZEN<sup>a</sup> ZWISCHEN (1-DESOXY-D-FRUCTOS-1-YL)-L-AMINOSÄUREN<sup>b</sup> UND N-NITROSODERIVATEN IN DEN  $\beta$ -D-PYRANOSE-FORMEN

Verbindung	C-1 ( $\alpha$ -NNO, $\alpha$ -NH)	C-2 ( $\beta$ -NNO, $\beta$ -NH)	C-2' ( $\alpha$ -NNO, $\alpha$ -NH)	C-3' ( $\beta$ -NNO, $\beta$ -NH)
<b>1</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	5.03	2.67	0.6	
<b>2</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	3.93 -2.24	2.42 2.31	0.62 7.13	-2.13 1.61
<b>3</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	6.27 -0.60	2.99 2.82	0.69 9.08	-2.81 1.94
<b>4</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	4.51 -2.10	2.46 2.34	-4.84 -0.46	-3.29 0.42
<b>5</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	' -2.08	3.00 3.00	1.65	-0.56 1.22
<b>6</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	5.70 -1.85	2.60 2.34	-0.71 5.29	-1.59 1.45
<b>7</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	5.53 -1.47	2.96 2.77	-5.72 0.28	
<b>8</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	4.70 -2.30	2.51 1.89	0.58 6.78	0.82 1.05
<b>9</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	4.38 -3.57	2.42 2.49	-0.77 1.96	-0.43 3.17
<b>10</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	4.79 -2.40	2.62 2.54	1.04 6.44	-3.24 1.35
<b>11</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	'		-1.90	-3.56 2.44
<b>12</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	5.14	2.85 2.85		-3.40 0.05
<b>13</b> $\beta$ -p <i>Z</i> <i>E</i>	5.53 -1.92	3.29 3.26	2.70 8.06	-2.84 1.88

<sup>a</sup>Lösungen in D<sub>2</sub>O.  $\Delta\delta$ -Werte (N=N=O minus NH) in p.p.m. <sup>b</sup>Zit. 16. <sup>c</sup>H-D-Austausch.

toseaminosäuren") **1–13** wurden durch Nitrosierung der entsprechenden *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-aminosäuren<sup>16</sup> mit Natriumnitrit in wässrig salzsaurer Lösung (pH 3) als salzhaltige, gut lagerfähige Verbindungen mit 6–13% Natriumchlorid erhalten. Durch Ionenaustauschchromatographie mit saurem und basischem Ionenaustauscher können die salzfreien **1–13** gewonnen werden, die hygroskopisch sind. Nach Lösen der Verbindungen **1–13** in D<sub>2</sub>O tritt schnelle Mutarotation ein. Die hochaufgelösten 400-MHz <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren sind durch das Vorliegen verschiedener Zucker-Ringformen, wie bei den Edukten<sup>16,11</sup>, sehr komplex. Zusätzlich treten hier für alle Protonen Signalverdopplungen durch *E/Z*-Isomere auf. Nur die Signale der  $\beta$ -D-Pyranose-Formen, deren Anteil im Lösungsgleichgewicht mehr als 50% beträgt, können eindeutig zugeordnet werden. Die Signale der Ringprotonen H-3–H-6b für die *E*- und *Z*-Isomeren treten in einem

engen Bereich von  $\delta$  3.22–3.91 auf (Tab. I-II). Die H-1a, H-1b und H-2'-Signale sind für die E- und Z-Isomeren im Vergleich mit den Edukten durch die N-Nitrosierung stark zu tiefem Feld verschoben, während die Verschiebungen für die übrigen Protonen gering sind (Tab. IV). Bemerkenswert ist der  $\Delta\delta$ -Wert von –0.2––0.4 p.p.m. für H-3 in den E-Isomeren (Z-Isomere:  $\Delta\delta$  H-3: –0.01–+0.01 p.p.m.). Er deutet auf eine Konformation hin, bei der das axiale H-3 des E-Isomeren im Anisotropiekegel (Anisotropieellipsoid) der N-NO-Gruppe zu hohem Feld verschoben wird. Für H-1a und H-1b wird bei längerem Stehen in Deuteriumoxyd H-D-Austausch beobachtet, z.B. bei 2, 3 und 7. Die beobachteten chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten (Tab. I-III) der Verbindungen 1–13 im Zucker-( $\beta$ -D-Pyranose) und Aminosäureteil sind wie erwartet. Die H-1 Signale der E- und Z-Isomeren erscheinen als Dubletts (AB-System). Die Ringkonformation für alle E- und Z-Isomeren  $\beta$ -Pyranosen ist  $^2C_5(D)$ , wie durch die Kopplungskonstanten belegt wird. Die trans-diaxiale Anordnung von H-3,4 gibt Anlaß zu großen  $J_{3,4}$  9.8 Hz Kopplungskonstanten. Aus den Integralverhältnissen gut separierter Protonenresonanzen z.B. H-2' oder anderen Aminosäure-Protonen können die prozentualen Anteile E/Z-isomerer N-(1-Desoxy-D-fructopyranos-1-yl)-N-nitroso-L-aminoäuren im Lösungsgleichgewicht bestimmt werden. Wegen des gleichzeitigen Vorliegens von Furanose-Formen sind diese Bestimmungen ungenau. Eine genauere Bestimmung gestattet die Auswertung der  $^{13}C$ -N.m.r.-Spektren (s.u.).

Die  $^{13}C$ -N.m.r.-Spektren von 1–13 in Deuteriumoxyd wurden mit Aceton als innerem Standard aufgenommen (Tab. V).  $^{13}C$ -Resonanzen aller vier Ringformen ( $\alpha,\beta$ -D-Pyranosen und  $\alpha,\beta$ -D-Furanosen) mit Signalverdopplungen durch E/Z-Isomere werden beobachtet. Signale von offenkettigen Formen sind nicht vorhanden. Im Lösungsgleichgewicht einer Verbindung müssen die  $^{13}C$ -Resonanzen von bis zu acht Isomeren nebeneinander zugeordnet werden. Im Vergleich mit den Edukten<sup>16</sup> sind in den N-Nitroso-Verbindungen ( $\beta$ -D-Pyranosen) die C-1-Resonanzen der Z-Isomeren (N=N=O *anti* zu C-1) um 3.93–6.27 p.p.m. Tieffeld verschoben, ebenso die C-2-Resonanzen der Z-Isomeren mit 2.42–3.29 p.p.m. und die der E-Isomeren (N=N=O *syn* zu C-2) mit 1.89–3.26 p.p.m. Die C-1-Resonanzen der E-Isomeren  $\beta$ -D-Pyranosen (N=N=O *syn* zu C-1) sind durch die N-Nitrosierung mit  $\Delta\delta$ -Werten (N=N=O – NH): –0.62 – –3.57 stärker Hochfeld verschoben als die der Edukte. Hierin manifestiert sich der starke anisotrope Effekt der N-Nitroso-Gruppe, der die Tieffeldverschiebung (–I-Effekt) überkompenziert (Tab. VI). Der Einfluß der N-Nitroso-Gruppe auf die anderen Ring-Kohlenstoffatome ist gering, auf die anderen Kohlenstoffatome im Aminosäureteil sehr unterschiedlich. Die hinsichtlich des Vorzeichens und des Betrages unterschiedlichen  $\Delta\delta$ -Werte bei den E- und Z-Isomeren deuten hier auf unterschiedliche Konformationen im Aminosäureteil durch freie Drehbarkeit hin. Die Zuordnung der  $^{13}C$ -Resonanzen erfolgte in Analogie zu den Edukten<sup>16</sup>. Aus den Integralverhältnissen von C-3, C-4 und C-5 (Mittelwerte) für die E/Z-Isomeren aller Ringformen konnten die prozentualen Anteile aller Isomeren im Lösungsgleichgewicht be-

TABELLE VII

VERHÄLTNISSE (%) DER Z- UND E-ISOMERE VON 1-13 AUS  $^{13}\text{C}$ -N.M.R.-SPEKTREN BESTIMMT<sup>a</sup>

Verb.	$\beta$ -D-Pyranose		$\beta$ -D-Furanose		$\alpha$ -D-Furanose		$\alpha$ -D-Pyranose	
	Z	E	Z	E	Z	E	Z	E
1	71	12		14		4		
2	53	30	6	6	3	2		
3	30	47		18		5		
4	48	25	8	8		6		5
5	21	47	3	22	2	5		
6	36	25	16	7		8		8
7	22	22	15	17	12	6		6
8	44	30	8	8	3	3		5
9	60	26		7		7		
10	53	27	8	7	3	2		
11	60	40						
12	50	25	7	7	5	5		
13	51	34		8		7		

<sup>a</sup>Lösungen in  $\text{D}_2\text{O}$ .

stimmt werden (Tab. VII). Es zeigt sich, daß mit wachsendem Raumbedarf des Aminosäurerestes in der Reihe Glycin, L-Alanin, L-Leucin, L-Valin, L-Isoleucin der Anteil an Z-Isomeren zugunsten der E-Isomeren abnimmt. Das Z/E-Verhältnis sinkt in dieser Reihe von 5.9 auf 0.5. Für die  $\beta$ -D-Pyranose-Formen der übrigen N-Nitroso-Zuckeraminosäuren werden Z/E-Verhältnisse von 1.0 bis 2.3 beobachtet, also ein Überwiegen der Z-Isomeren. Für die Furanose-Formen werden ähnliche Effekte beobachtet. *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-pyroglutaminsäure verfügt über keine nitrosierbare NH-Gruppe. Eine N-Nitroso-Verbindung wird daher bei der Nitrosierung nicht gebildet.

Die Nitrosierung von D-Fructose-L-tyrosin führt zu einem Produktgemisch aus 67% *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-tyrosin (**11**) und 33% zusätzlich in *ortho*-Position zur phenolischen OH-Gruppe des Tyrosinrestes Kern nitrosierten (nitrierten) Dinitrosoverbindung **14**, wie die  $^1\text{H}$ -N.m.r. spektroskopische Verfolgung der Nitrosierungsreaktion zeigte. Eine Auf trennung der beiden Nitrosierungsprodukte im präparativen Maßstab ist bisher nicht gelungen. Das Produktgemisch ist im Ames-Test negativ<sup>29,30</sup>. Die Nitrosierung von *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidin mit zwei NH-Gruppen führt nur zu einem Mononitrosoprodukt, dem *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-histidin (**12**). Die schwach basische Imidazolyl-NH-Gruppe wird nicht nitrosiert. Die Verbindung **12** ist im Ames-Test positiv<sup>30</sup>. Die Nitrosierung von D-Fructose-L-tryptophan mit Natriumnitrit in  $\text{D}_2\text{O}-\text{DCl}$  wurde mit dem 400-MHz  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektrometer zeitlich in Abhängigkeit vom pH Wert verfolgt. Bei pH 5 erfolgte keine Reaktion. Der Zusatz von Natriumthiocyanat zeigte keinen katalytischen Effekt auf die Nitrosierungsreaktion. Bei pH 4.5 wurde im  $^1\text{H}$ -N.m.r.-Spektrum eine langsame *N*-Nitrosierung

TABELLE VIII

GESAMTRETENTIONZEITEN IN L.C. MIT UMKEHRPHASIONENPAARCHROMATOGRAPHIE<sup>a</sup> VON 1-13 UND 15

Verbindung	t <sub>R</sub> (min)
1	4.10
2	4.65
3	7.55 <sup>b</sup>
4	14.70 <sup>b</sup>
5	12.30 (Z, 20%), 13.10 (E, 80%)
6 <sup>c</sup>	4.00 (Z, 95%), 4.65 (E, 5%)
7	3.85 <sup>b</sup>
8	10.40 <sup>b</sup>
9	6.10
10	31.50
11 <sup>d</sup>	12.20 (Z, 40%), 12.50 (E, 60%)
12	9.90
13	58.10 (Z, 70%), 62.50 (E, 30%)
15	10.10
NaNO <sub>2</sub> -H <sub>2</sub> O	4.60

<sup>a</sup>Säule: 30 cm  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> (10  $\mu$ m Partikel), 3.9 mm I.D. (Waters); mobile Phase: Wasser-Acetonitril 9:1 (v/v) mit 50 mM Tetrabutylammoniumphosphat, pH 7.5 (PIC A, Waters) als Ionenpaarreagenz; u.v.-Detektion bei 254 nm; 1 mL/min (3.4 MPa); Nachweisgrenze: ~5 ng. <sup>b</sup>Peak-Schultern von E/Z-Isomeren. <sup>c</sup>Aus dem <sup>13</sup>C-n.m.r.-Spektrum wird ein Verhältnis von ~60% Z- und 40% E-Isomer bestimmt. <sup>d</sup>Zusätzlicher Peak bei t<sub>R</sub> 22.0 min: Kern nitrosiertes (nitriertes) 11.

beider NH-Gruppen beobachtet. Dies wurde sichtbar durch das Auftreten von Tieffeld verschobenen Signalen für H-2' (dd) und Indolyl-H-2 (s). Bei pH 4 ist die Nitrosierungsreaktion sehr schnell.

Bonnell und Holleyhead<sup>32</sup> präparierten kristalline Derivate von  $\alpha$ -N-Acetyl-N<sup>Ind</sup>-nitroso-L-tryptophan. Kurovsky und Hoffmann<sup>33</sup> ermittelten für die Nitrosierungskinetik von  $\alpha$ -N-Acetyltryptophan eine lineare Beziehung zwischen Salpetrigersäure und Aminosäurekonzentration. Nakai *et al.*<sup>34</sup> untersuchten die Indol-N-Nitrosierung von L-Tryptophan und beobachteten, daß die Reaktion bei pH 4.0 schnell und bei pH 5.5 sehr langsam verlief. Es gelang ihnen nicht N-Nitroso-L-Tryptophan aus dem Nitrosierungsansatz gelchromatographisch abzutrennen. Sie schlossen daraus eine Reversibilität der Reaktion durch NO-Abspaltung während der Trennung. Beim Eluieren mit Nitrit-Gültige Pufferlösungen wurde ein Substanzpeak eluiert, der dem N-Nitroso-L-tryptophan zugeordnet wurde. In einem präparativen Nitrosierungsansatz von N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-tryptophan konnten nach chromatographischer Trennung und Entsalzung 31% N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-tryptophan (13) und 13% N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-("N<sup>Ind</sup>-nitroso")-L-tryptophan (15) als Reinsubstanzen isoliert und spektroskopisch eindeutig charakterisiert werden. Von den beiden Mono-Nitrosoprodukten war nur 13 im Ames-Test positiv<sup>29</sup>.

Die e.i. Massenspektren der per(trimethylsilylierten N-(1-Desoxy-D-fructos-

TABELLE IX

pK-WERTE VON AMINOSÄUREN<sup>a</sup>, (1-DESOXY-D-FRUCTOS-1-YL)-L-AMINOSÄUREN, 1-3 UND 7<sup>b</sup>

Verbindung	pK-Werte	
	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
Glycin	2.35	9.78
(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)glycin	2.72	8.21
<b>1</b>	3.30	
L-Alanin	2.35	9.87
(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-alanin	2.75	8.22
<b>2</b>	3.30	
L-Valin	2.29	9.72
(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-valin	2.66	8.08
<b>3</b>	3.10	
L-Threonin	2.15	9.12
(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-threonin	2.70	7.29
<b>7</b>	3.25	
Ameisensäure	3.47	

<sup>a</sup>Zit. 36. <sup>b</sup>Lösungen in Wasser bei 25°.

1-yl)-N-nitroso-L-aminosäuren zeigen keine Molekülionen und Ionen ( $M^+ - NO$ ). Neben Ionen ( $M^+ - CH_3$ ) (1%) werden für diese Verbindungsklasse charakteristische Zuckerfragmente bei  $m/z$  437 (15–36%) beobachtet, die durch Abspaltung von  $H_2CN(NO)CHRCO_2$  Me<sub>3</sub>Si-Radikalen aus den Molekülionen entstehen. Der weitere Zerfall entspricht dem von per(trimethylsilyl)ierten Hexosen.

Als leistungsfähige und empfindliche spurenanalytische Trenn- und Nachweismethode für schwerflüchtige N-NO-Fructoseaminosäuren erweist sich die Umkehrphasen-Ionenpaar-Hochdruckflüssigkeitschromatographie<sup>35</sup> mit u.v.-Detektion bei 254 nm. Zur mobilen Phase Wasser-Acetonitril (9:1) wird Tetrabutylammoniumphosphat als Ionenpaar-Reagenz für die ionischen Carboxylgruppen im Aminosäureteil zugesetzt. Tab. VIII zeigt die Gesamtretentionszeiten der N-NO-Fructoseaminosäuren unter Standardbedingungen. Für einige Verbindungen werden mit dem u.v.-Detektor E/Z-Isomere als Peakschultern für andere als getrennte Peaks registriert. Bei letzteren entsprechen die aus den Peakflächen ermittelten E/Z-Isomerenverhältnisse (%) etwa denen aus den <sup>13</sup>C-N.m.r.-Spektren ermittelten, wenn die E/Z-Isomerenanteile jeweils für alle Ringformen aufsummiert werden; vgl. Tab. VII. Das Z-Isomer wird schneller als das E-Isomer von der Säule eluiert. Die Nachweisgrenze für den u.v.-Detektor bei 254 nm beträgt ~5 ng N-NO-Fructoseaminosäure. Damit steht eine mikroanalytische Methode zur Verfügung, die es erlaubt nach diesen schwerflüchtigen N-Nitroso-Verbindungen in "verdächtigen" Nahrungsmitteln, wie Nitrit haltigen Maillard-Systemen, zu fahnden.

Tab. IX zeigt eine Zusammenstellung gemessener pK-Werte ausgewählter Fructose- und N-NO-Fructoseaminosäuren im Vergleich mit denen von Aminosäuren (Literaturwerte)<sup>36</sup>. Die pK<sub>1</sub>-Werte der ausgewählten Aminosäuren nehmen nach N-Fructosylierung um 0.37–0.55 pK-Einheiten zu, während gleichzeitig die pK<sub>2</sub>-Werte sehr viel stärker um 1.57–1.83 Einheiten abnehmen. Die Acidität der Carboxylgruppe nimmt in geringerem Maße ab, als die Basizität der Aminogruppe. N-Nitrosierung der Fructoseaminosäuren bewirkt Aufhebung des basischen Charakters und weitere Zunahme der pK<sub>1</sub>-Werte um 0.44–0.58 Einheiten. Die Säurestärken der N-NO-Fructoseaminosäuren liegen mit pK-Werten von 3.10–3.25 im Bereich der Säurestärke von Ameisensäure (pK 3.47).

#### EXPERIMENTELLER TEIL

*Allgemeine Methoden.* — Schmelzpunkte (unkorrigiert): Leitz Heiztischmikroskop. Optische Drehungen  $[\alpha]_{589}$ : Perkin-Elmer 243 (1 dm Küvette). Alle Reaktionen und Trennungen wurden dünnsschichtchromatographisch auf Kieselgelfolie G 60 F<sub>254</sub> (Merck) oder Cellulosefolie F<sub>254</sub> (Merck) mit Chloroform-Methanol-konz. NH<sub>3</sub> (3:3:1) oder Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) als Laufmittel verfolgt. Detektion erfolgte durch Sprühen mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder 0.3% ethanolischer Naphtoresorcinol-Lösung in M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) für Edukte und Nitrosoprodukte, mit 0.3% ethanolischer Nihydrin-Lösung für Fructoseaminosäuren. N-Nitrosofructoseaminosäuren zeigen violette Fluoreszenz beim Betrachten unter u.v. Licht (254 nm) und/oder werden durch 5 min Bestrahlung mit u.v. Licht (254 nm) und Sprühen mit "Griessreagenz-Lösung"<sup>37</sup> als rosarote Azofarbstoffe detektiert. Ionenaustausch-Chromatographie erfolgte an Dowex 50W X-8 (H<sup>+</sup>) Harz (100–200 mesh) und Dowex 2 X-8 (OH<sup>-</sup>) Harz (20–50 mesh) (Serva), Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 (Merck). Flüssigkeitschromatographie (erhöhter Druck): Waters ALC 100 mit u.v.-Durchflußphotometer (254 nm), Differentialrefraktometer und U6K Injektionssystem. Säule: 30 cm μ-Bondapak C<sub>18</sub> (10 μm Partikel), 3.9 mm I.D. (Waters). Mobile Phase: Wasser-Acetonitril (9:1) mit 0.05M Tetrabutylammoniumphosphat (PIC A, Waters) als Ionenpaarreagens, 1 mL/min (3.4 MPa). <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-N.m.r.-Spektren für Lösungen in D<sub>2</sub>O mit 0.3–0.5% Aceton als innerem Standard: Bruker WH 270 (270 und 67.89 MHz), Bruker WH 360 (360 und 90.52 MHz) und Bruker WM 400 (400 und 100.57 MHz). <sup>1</sup>H-N.m.r. Proben wurden durch mehrmaliges Abziehen mit D<sub>2</sub>O einem H-D-Austausch unterworfen. Signalzuordnungen in den <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektren erfolgten durch Doppelresonanzexperimente. In den <sup>1</sup>H-Breitband entkoppelten p.f.t. <sup>13</sup>C-N.m.r.-Spektren wurden Signalzuordnungen durch "Off Resonanz" Spektren und durch gekoppelten Spektren ("gated decoupling") vorgenommen. I.r.-Spektren (KBr-Preßling): Perkin-Elmer 399, 70 eV E.i.-Massenspektren der Me<sub>3</sub>Si-Derivate (Direktienlaß): MAT 311 A, CH 7 (Varian). Herstellung der Me<sub>3</sub>Si-Derivate: die N-NO-Fructoseaminosäuren werden in einem Schraubdeckelgläschen mit über-

schüssigem *N*-Trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA, Macherey & Nagel) versetzt und bei 20° einige Stunden lang bis zur klaren Lösung stehen gelassen. Zur schnellen Umsetzung kann auf 40–50° erwärmt werden, ohne daß Bräunung auftritt. pK Werte werden mit Hilfe einer Glaselektrode durch Titration mit eingestellter NaOH und eingestellter HCl bestimmt (Halbneutralisationspunkt): 1 mmol bzw. 0.1 mmol der Fructoseaminosäure oder *N*-NO-Fructoseaminosäure werden in dest. Wasser (10 mL) gelöst (0.1 bzw. 0.01 M Lösungen). Es wird mit 0.1 M bzw. 0.01 M HCl und NaOH titriert und die pK-Werte aus den Titrationskurven entnommen. Die pK-Werte der Aminosäuren wurden der Literatur entnommen<sup>36</sup>.

*Allgemeine Vorschrift zur Darstellung der N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-aminosäuren (N-Nitrosofructoseaminosäuren) (1–13) (AV).* — (a) *Salzhaltige Produkte.* Die *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-aminosäure (Fructoseaminosäure)<sup>16,22</sup> (-glycin, -L-alanin, -L-valin, -L-leucin, -L-isoleucin, -L-serin, -L-threonin, -L-methionin, -L-asparaginsäure, -L-phenylalanin, -L-tyrosin, -L-histidin oder -L-tryptophan) (1 mmol) wird in Wasser (5 mL) gelöst und mit verdünnter HCl auf pH 3 eingestellt. Unter Eiskühlung und Röhren wird NaNO<sub>2</sub> (2 mmol) in Wasser (2 mL) zugesetzt. T.l.c. Kontrolle zeigt nach 6 min bis 5 h quantitative Umsetzung zu der *N*-NO-Fructoseaminosäure (1–13). Die *N*-Nitroso-Produkte zeigen auf dem Dünnschichtchromatogramm um 0.1–0.2 größere *R*<sub>F</sub>-Werte als die Edukte. Der Ansatz wird *in vacuo* bei 25° zur Trockne gebracht und zweimal mit Ethanol destilliert oder gefriergetrocknet. Die *N*-NO-Fructoseaminosäuren bleiben als weiße bis weißgelbe salzhaltige Pulver mit 6–14% NaCl zurück, die in braunen Flaschen unter Feuchtigkeitsausschluß bei Zimmertemperatur unbegrenzt stabil sind.

(b) *Salzfreie Produkte.* Die ursprünglich verwendete Entsalzungsmethode zur Gewinnung von analytischen Mengen hochreiner Verbindungen für die Elementaranalyse und zur Ermittlung der spezifischen Drehungen durch Extraktion der trockenen salzhaltigen *N*-NO-Zuckeraminosäuren mit wasserfreiem Pyridin<sup>27</sup> wurde verbessert. Der Nitrosierungsansatz wird mit Wasser verdünnt und über eine Kationenaustauschersäule mit Dowex 50W X-8 (H<sup>+</sup>; 100–200 mesh) eluiert. In das saure Eluat wird portionsweise Anionenaustauscher Dowex 2 X-8 (OH<sup>−</sup>; 20–50 mesh), bis pH 3 eingetragen. Es wird vom Austauscher abfiltriert, das Filtrat gefriergetrocknet und der Rückstand im Exsikkator (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) aufbewahrt. Die salzfreien *N*-Nitroso-Fructoseaminosäuren 1–13 bleiben als weiße bis weißgelbe Pulver zurück. Die Ausbeuten mit dieser Entsalzungsmethode betragen je nach *N*-Nitroso-Verbindungen bis zu 95%. Die salzfreien Verbindungen sind unter Licht- und Feuchtigkeitsausschluß stabil. Sie zeigen weder Schmelz- noch Zersetzungspunkte. Beim Aufheizen unter dem Heizmikroskop wird Bräunung beobachtet. Die Verbindung sind in salzfreiem Zustand stark hygroskopisch. Für die Elementaranalyse muß 6–12 h lang im Exsikkator (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) an der Ölzpumpe getrocknet werden. Die Einwaagen erfolgen unter Inertgas.

*Versuche zur Vollentsalzung der salzhaltigen *N*-NO-Fructoseaminosäuren mit einem Mischbett-Ionenaustauscher (ion-retardation resin AG 11A8, Bio-Rad*

Labs.) schlugen fehl. Dieser Austauscher ist nur für die Entsalzung nichtionischer Substanzen geeignet. Servachrom XAD (150–200 µm), ein Adsorberharz auf Polystyrolbasis, eignet sich zur Entsalzung von *N*-NO-Fructoseaminosäuren mit Aromaten oder Heteroaromaten im Aminosäureteil. Die salzhaltigen, wässrigen Lösungen der *N*-NO-Fructoseaminosäuren werden auf eine Säule, die mit diesem Harz gefüllt ist, aufgetragen und die Salze mit Wasser eluiert, während die aromatischen Verbindungen von der Polystyrolmatrix adsorbiert werden. Die Elution dieser Verbindungen vom Harz erfolgt mit Methanol oder Ethanol.

Andere Versuche zur Darstellung der salzfreien *N*-Nitroso-Verbindungen schlugen fehl. Nitrosierung der Fructoseaminosäuren mit N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Gas durch Einleiten (0.5–2 min) in die wässrigen Lösungen bei 0° oder Umsetzung mit Ethylnitrit in Wasser-Ethanol bei 20°, anschließende "Neutralisation" der Ansätze mit basischem Ionenaustauscher bis pH 3–4 und Gefriertrocknung führten zu dünn-schichtchromatographisch uneinheitlichen Verbindungen. Obwohl die t.l.c.-Kontrolle der Nitrosierungsreaktionen quantitative Umsetzungen ohne Bildung von Nebenprodukten zeigte, tritt beim Gefriertrocknen durch Spuren HNO<sub>2</sub> oder von Stickoxiden Zersetzung ein. Der Rückstand ist viskos und riecht nach Nitrosen Gasen.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitrosoglycin (1).** — *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)glycin (237 mg, 1 mmol) werden mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert, entsalzt und gefriergetrocknet; weißes Pulver (230 mg, 86%),  $[\alpha]_D^{20} -78.1^\circ$  (*c* 0.46, Wasser);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1380 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat): *m/z* 611 (1%, M – CH<sub>3</sub>), 437 {36%, M – 189, [H<sub>2</sub>CN(NO)CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Me<sub>3</sub>Si]}, 347 (6), 319 (8), 305 (4), 257 (13), 217 (41), 204 (10).

*Anal.* Ber. für C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (266.2): C, 36.09; H, 5.30; N, 10.52. Gef.: C, 36.32; H, 5.27; N, 10.84.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-alanin (2).** — *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-alanin (251 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; gelb weißes Pulver (250 mg, 89%),  $[\alpha]_D^{20} -50.2^\circ$  (*c* 0.22, Wasser);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1380 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat): *m/z* 625 (1%, M – CH<sub>3</sub>), 437 {18%, M – 203 [CH<sub>2</sub>N(NO)CH(CH<sub>3</sub>)CO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>]}, 347 (4), 319 (4), 305 (3), 291 (4), 257 (11), 217 (27), 204 (5).

*Anal.* Ber. für C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (280.3): C, 38.57; H, 5.76; N, 10.00. Gef.: C, 38.47; H, 5.58; N, 10.27.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-valin (3).** — *N*-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-valin (279 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; weißes Pulver (260 mg, 84%),  $[\alpha]_D^{20} -115.9^\circ$  (*c* 0.26, Wasser);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1380 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat): *m/z* 653 (2%, M – CH<sub>3</sub>), 437 {33%, M – 231, [H<sub>2</sub>CN(NO)CH(CO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>)CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]}, 347 (8), 319 (9), 305 (3), 257 (16), 204 (14).

*Anal.* Ber. für C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (308.3): C, 42.86; H, 6.54; N, 9.09. Gef.: C, 43.15; H, 6.50; N, 9.39.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-leucin (4).** — *N*-(1-Desoxy-D-fruc-

tos-1-yl)-L-leucin (293 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; weißes Pulver (268 mg, 83%),  $[\alpha]_D^{20} -44.1^\circ$  (c 0.86, Wasser);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1385 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat): *m/z* 667 (0.2%, M - CH<sub>3</sub>), 437 {13%, M - 245 [H<sub>2</sub>CH(NO)CH(CO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]}, 347 (3), 319 (4), 305 (4), 257 (6), 217 (47), 204 (8).

*Anal.* Ber. für C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (322.3): C, 44.72; H, 6.88; N, 8.69. Gef.: C, 43.96; H, 6.50; N, 8.50.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-isoleucin (5).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-isoleucin* (293 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; weißes Pulver (279 mg, 87%).  $[\alpha]_D^{20} -39.3^\circ$  (c 0.38, Wasser);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1375 cm<sup>-1</sup> (N=N=O).

*Anal.* Ber. für C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (322.3): C, 44.72; H, 6.88; N, 8.69. Gef.: C, 44.52; H, 6.73; N, 8.75.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-serin (6).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-serin* (267 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert, entsalzt und gefriergetrocknet; gelbes Pulver (274 mg, 93%).  $[\alpha]_D^{20} -123.8^\circ$  (c 0.63, Wasser);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1385 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat): *m/z* 713 (0.2%, M - CH<sub>3</sub>), 536 (19), 437 {15%, M - 291, [H<sub>2</sub>CN(NO)CH(CO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>OSiMe<sub>3</sub>]}, 347 (4), 319 (5), 305 (2), 257 (18), 217 (53), 204 (20).

*Anal.* Ber. für C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (296.2): C, 36.49; H, 5.44; N, 9.46. Gef.: C, 36.12; H, 5.65; N, 8.98.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-threonin (7).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-threonin* (281 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; gelb weißes Pulver (296 mg, 95%).  $[\alpha]_D^{20} -117.4^\circ$  (c 0.48, Wasser);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1385 cm<sup>-1</sup> (N=N=O).

*Anal.* Ber. für C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> (310.3): C, 38.71; H, 5.85; N, 9.03. Gef.: C, 38.57; H, 6.08; N, 8.84.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-methionin (8).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-methionin* (311 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; weißes Pulver (323 mg, 95%).  $[\alpha]_D^{20} -72.3^\circ$  (c 0.23, Wasser).

*Anal.* Ber. für C<sub>11</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S (340.4): C, 38.82; H, 5.92; N, 8.23; S, 9.42. Gef.: C, 38.62; H, 5.76; N, 8.18; S, 9.12.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-asparaginsäure (9).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-asparaginsäure* (295 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; gelbes Pulver (302 mg, 93%).  $[\alpha]_D^{20} -118.8^\circ$  (c 0.53, Wasser).

*Anal.* Ber. für C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub> (324.2): C, 37.04; H, 4.97; N, 8.64. Gef.: C, 36.86; H, 5.19; N, 8.34.

*N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-phenylalanin (10).* — *N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-phenylalanin* (327 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert und aufgearbeitet; weißgelbes Pulver (300 mg, 84%),  $[\alpha]_D^{20} -132.3^\circ$  (c 0.56, Wasser);  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  1385 cm<sup>-1</sup> (N=N=O); m.s. (70 eV; Me<sub>3</sub>Si-Derivat):

*m/z* 701 (0.8%, M – CH<sub>3</sub>), 437 {28%, M – 279, [H<sub>2</sub>CN(NO)CH(CO<sub>2</sub>SiMe<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>Phe]}, 347 (5), 319 (5), 305 (3), 257 (13), 217 (28), 204 (7).

Anal. Ber. für C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (356.3): C, 50.56; H, 5.66; N, 7.86. Gef.: C, 50.30; H, 5.92; N, 7.66.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-tyrosin (11).** — N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-tyrosin (343 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 1 mmol) nach AV nitrosiert. Nach 30 min zeigt die t.l.c.-Kontrolle fast quantitative Umsetzung. Der rötlich gelbe Ansatz wird 24 h lang im Kühlschrank aufbewahrt. Danach zeigen sich am Start und an der Laufmittelfront u.v. aktive Produkte, die mit Zucker- und Griess-Reagenz nachweisbar sind. Nach Aufarbeitung durch Einengen bei 30° *in vacuo* und Destillieren mit Ethanol erhält man die salzhaltige Verbindung 11 (420 mg) als rötlich gelbes Pulver. Sie lässt sich aus dem Rückstand mit Wasser herauslösen und ergibt nach Gefrieretrocknung ein gelbes Pulver (300 mg), R<sub>F</sub> (Butanol-Eisessig-Wasser 2:1:1) 0.40. Der rote wasserunlösliche Rückstand ist in Ethanol löslich, R<sub>F</sub> (gleiches Laufmittel) 0.75. Die Verbindung zeigt im <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektrum starke Veränderungen im Zuckerbereich durch Artefaktbildung.

Das <sup>1</sup>H-n.m.r. Spektren von 11 zeigt Veränderungen im Aromatenbereich durch Ring-C-Nitrosierung (Nitrierung). Das Produktverhältnis von N-Nitroso-Verbindung zu C-Nitroso(Nitro)-Verbindung beträgt nach dem Integralverhältnis 67 zu 33%. Das Produktgemisch 11 und 14 wird mit Servachrom XAD Adsorberharz entsalzt, wobei ein gelbes Pulver (200 mg) erhalten wird. Eine Auftrennung von 11 und 14 ist bisher nicht gelungen.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-histidin (12).** — N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-histidin (321 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (138 mg, 2 mmol) nach AV nitrosiert. Eine Entsalzung mit Dowex 50W X-8 und Dowex 2 X-8 gelingt nicht, da die Verbindung von der Polystyrolmatrix irreversibel adsorbiert wird. Nach mehrfacher Destillation mit Wasser und Toluol wird gefriergetrocknet und 12 (450 mg) als gelbes salzhaltiges Pulver erhalten.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-N-nitroso-L-tryptophan (13).** — N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-L-tryptophan (366 mg, 1 mmol) wird mit NaNO<sub>2</sub> (276 mg, 4 mmol) nach AV nitrosiert. Die anfangs rötlich gelbe Lösung ändert ihre Farbe nach gelbgrün. T.l.c. Kontrolle nach 6 h mit Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) als Laufmittel zeigt Umsetzung zu 5 Produkten mit R<sub>F</sub> 0.18 (~35%), sichtbar im u.v. Licht (254 und 366 nm), mit Naphtoresorcinol-Lösung und u.v.-Bestrahlung-Griess-Reagenz, R<sub>F</sub> 0.29, 0.34 und 0.60 (Spuren), die weder mit Zucker- noch mit Griess-Reagenz reagieren, jedoch u.v. aktiv sind und eine Substanz mit R<sub>F</sub> 0.43 (~60%), die sowohl mit Zucker- als auch auf u.v.-Bestrahlung-Griess-Reagenz reagiert und u.v. aktiv ist.

Während der Reaktion fiel ein roter Feststoff aus, der abfiltriert wurde und sich als gut Ethanol löslich erwies (R<sub>F</sub> 0.60). Bei längerem Stehen oder nach mehrmaligem Abziehen mit Ethanol *in vacuo* wird die Substanz durch Verharzung zunehmend schlechter löslich. Das <sup>1</sup>H-N.m.r.-Spektrum zeigt Artefaktbildung im Bereich der Zuckerpotonen, jedoch keine Signale des Aminosäurerestes im

### Aromatenbereich (Indolylsystem).

Nach Gefriertrocknung des Filtrates blieb ein gelbes Pulver zurück. Das Hauptprodukt ( $R_F$  0.43) wurde an einer Kieselgelsäule mit Wasser gesättigtem Butanol als Elutionsmittel abgetrennt. Nach Abziehen des Lösungsmittels *in vacuo* blieb salzhaltiges **13** (200 mg) zurück. Entsalzung erfolgte mit Servachrom XAD-Adsorberharz durch Auftragen der wässrigen Lösung und Elution der Salze mit Wasser. Anschließende Elution mit Methanol und Gefriertrocknung ergibt **13**, gelbes Pulver (120 mg, 31%).  $[\alpha]_D^{20} -79.6^\circ$  (*c* 0.4, Wasser);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1380  $\text{cm}^{-1}$  (N=N=O).

*Anal.* Ber. für  $C_{17}H_{21}N_3O_8$  (395.4): C, 51.64; H, 5.35; N, 10.63. Gef.: C, 51.24; H, 5.35; N, 10.42.

**N-(1-Desoxy-D-fructos-1-yl)-(N<sup>Ind</sup>-nitroso)-L-tryptophan (15).** — Das *N*-Nitroso-Produkt mit  $R_F$  0.18 ließ sich nicht durch Chromatographie an Kieselgel mit Wasser gesättigtem Butanol abtrennen. Es wird irreversibel adsorbiert. In einem weiteren Nitrosierungsansatz wurde die Substanz durch präparative Schichtchromatographie (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 2 mm, Merck) mit Butanol-Eisessig-Wasser (2:1:1) als Laufmittel abgetrennt und mit Servachrom XAD-Adsorberharz entsalzt, gelbes Pulver (50 mg, 13%).  $[\alpha]_D^{20} -68.2^\circ$  (*c* 0.3, Wasser);  $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$  1475  $\text{cm}^{-1}$  (N=N=O).

*Anal.* Ber. für  $C_{17}H_{21}N_3O_8$  (395.4): C, 51.64; H, 5.35; N, 10.63. Gef.: C, 51.34; H, 5.39; N, 10.62.

### DANK

Herrn Dr. Bernd Meyer, Universität Oldenberg, danke ich für die Aufnahme der N.m.r. Spektren und wertvolle Diskussionen.

### LITERATUR

- 1 L. C. MAILLARD, *C.R. Séances Hebd. Acad. Sci., Ser. C*, 154 (1912) 66–68; 155 (1912) 1554–1556; 156 (1913) 1159–1160.
- 2 L. C. MAILLARD, *Ann. Chim. (Paris)*, 5 (1916) 258–317; 7 (1917) 113–152.
- 3 J. E. HODGE, *J. Agr. Food Chem.*, 1 (1953) 928–943.
- 4 J. P. DANHEY UND W. W. PIGMAN, *Adv. Food Res.*, 3 (1951) 241–290.
- 5 G. P. ELLIS, *Adv. Carbohydr. Chem.*, 14 (1959) 63–134.
- 6 K. HEYNS UND H. PAULSEN, *Wiss. Veroeff. Dtsch. Ges. Ernaehr.*, 5 (1960) 15–42.
- 7 T. M. REYNOLDS, *Adv. Food Res.*, 12 (1963) 1–52; 14 (1965) 167–283.
- 8 T. M. REYNOLDS, IN H. W. SCHULTZ, R. F. CAIN UND R. W. WROLSTAD (Hrg.), *Symposium on Foods. Carbohydrates and their Roles*. The Avi Publ. Co., Inc., Westport, Connecticut, 1969, pp. 219–252.
- 9 A. A. SPARK, *J. Sci. Food Agric.*, 20 (1969) 308–316.
- 10 A. GOTTSCHALK, IN A. GOTTSCHALK (Hrg.), *Glycoproteins: Their Composition, Structure and Function*, Elsevier, Amsterdam, 1972, pp. 141–157.
- 11 H. PAULSEN UND W. PFLUGHAUPT, IN W. PIGMAN UND D. HORTON (Hrg.), *The Carbohydrates*, Academic Press, New York, 1980, pp. 881–927.
- 12 H. ERBERSDOBLER UND G. BOCK, *Naturwissenschaften*, 54 (1967) 648.
- 13 K. HEYNS, J. HEUKESHOVEN UND K. H. BROSE, *Angew. Chem.*, 80 (1968) 627.
- 14 M. AMADORI, *Atti Accad. Naz. Lincei, Cl. Sci. Fis., Mat. Nat. Rend.*, 2 (1925) 337–342.
- 15 R. KUHN UND F. WEYGAND, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 70 (1937) 769–772.

- 16 H. RÖPER, S. RÖPER, K. HEYNS UND B. MEYER, *Carbohydr. Res.*, 116 (1983) 183–195.
- 17 J. MAURON, *Progr. Food Nutr. Sci.*, 5 (1981) 5–35.
- 18 B. HELFERICH UND A. MITROWSKY, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 85 (1952) 1–8.
- 19 E. F. L. J. ANET UND T. M. REYNOLDS, *Aust. J. Chem.*, 10 (1957) 182–197.
- 20 D. L. INGLES UND T. M. REYNOLDS, *Aust. J. Chem.*, 11 (1958) 575–580.
- 21 H. BORSOOK, A. ABRAMS UND P. H. LOWY, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 111–124.
- 22 K. HEYNS UND H. PAULSEN, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 622 (1959) 160–174.
- 23 J. R. COUGHLIN, *Formation of N-Nitrosamines from Maillard Browning Reaction Products in the Presence of Nitrite*, Dissertation, University of California, Davis, 1979, pp. 1–329.
- 24 H. RÖPER, in R. PREUSSMANN (Hrg.), *Das Nitrosamin Problem (Rundgespräche und Kolloquien der DFG)*, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, SS. 49–52; 189–211; 223–230; 231–234.
- 25 H. RÖPER, *Organische Umweltkarzinogene: Spurenanalyse und Entstehung von N-Nitroso-Verbindungen*, Habilitationsschrift, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, 1983, SS. 1–420.
- 26 H. RÖPER, K. HEYNS, S. RÖPER UND B. MEYER, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, (1982) 780–793.
- 27 K. HEYNS, S. RÖPER, H. RÖPER UND B. MEYER, *Angew. Chem.*, 91 (1979) 940–941; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 18 (1979) 878–880.
- 28 H. RÖPER, S. RÖPER, K. HEYNS UND B. MEYER, *IARC Sci. Publ.*, 41 (1982) 87–98.
- 29 B. L. POOL, H. RÖPER, S. RÖPER UND K. ROMRUEN, *Food Chem. Toxicol.*, 22 (1984) 797–801.
- 30 H. RÖPER, S. RÖPER UND B. MEYER, *IARC (Int. Agency Res. Cancer) Sci. Publ.*, 57 (1984) 101–111.
- 31 J. H. ALTENA, G. A. M. VAN DEN OUWELAND, C. J. TEUNIS UND S. B. TJAN, *Carbohydr. Res.*, 92 (1981) 37–49.
- 32 R. BONNETT UND R. HOLLEYHEAD, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, (1974) 962–964.
- 33 A. KUROVSKY UND T. HOFMANN, *Can. J. Biochem.*, 50 (1972) 1282–1296.
- 34 H. NAKAI, R. G. CASSSENS, M. L. GRAESER UND G. WOOLFORD, *J. Food Sci.*, 43 (1978) 1857–1860.
- 35 R. A. BIDLINGMEYER, *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (1980) 525–539.
- 36 R. WEAST (Hrg.), *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio.
- 37 R. PREUSSMANN, G. NEURATH, G. WULF-LORENTZEN, D. DAIBER UND H. HENGY, *Z. Anal. Chem.*, 202 (1964) 187–192.