

Trennung und Bestimmung von Amadori-Verbindungen mittels HPLC und Nachsäulenreaktion

Matthias Reutter* und Karl Eichner

Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster, Piusallee 7, D-4400 Münster, Bundesrepublik Deutschland

Separation and determination of Amadori compounds by high pressure liquid chromatography and post-column reaction

Summary. An HPLC method is described for the separation and determination of 16 Amadori compounds in dried vegetables and other vegetable products. Fructose, glucose and fructose-pyrrolidonic acid, the cyclization product of fructoseglutamic acid and fructoseglutamin, can also be detected by this method. After extraction of the samples with water, separation is performed by isocratic HPLC on DEAE silica gel using an acetonitrile phosphate buffer mobile phase. A post-column reaction with an alkaline solution of triphenyltetrazoliumchloride at 85 °C allows a very selective and sensitive photometric determination at 480 nm. Detection as low as 10–50 ng for the various Amadori compounds can be achieved. The analysis of a number of industrially dried vegetables led to concentrations of 0.01%–3.8% (in dried matter) for the individual compounds. The highest amounts of Amadori compounds were found in dried tomatoes, dried paprika and dried asparagus since the raw products contain high amounts of glucose and free amino acids, which are the precursors of the Amadori compounds.

Zusammenfassung. Es wird eine Methode beschrieben, mit der gleichzeitig 16 Amadori-Verbindungen in Trockengemüse und Gemüseprodukten bestimmt werden können. Zusätzlich werden Fructose, Glucose und Fructosepyrrolidoncarbonsäure, ein Cyclisierungsprodukt von Fructoseglutamin und Fructoseglutaminsäure, erfaßt. Nach Extraktion mit Wasser aus dem Untersuchungsmaterial erfolgt die isokratische HPLC-Trennung der Amadori-Verbindungen mittels Acetonitril/Phosphatpuffer an einer DEAE-Kieselgelsäule. Der empfindliche und spezifische

Nachweis der getrennten Verbindungen erfolgt durch post-column Umsetzung mit alkalischer Triphenyltetrazoliumchloridlösung bei 85 °C und anschließender Detektion des gebildeten Triphenylformazans bei 480 nm. Die Nachweisgrenzen liegen bei 10 ng bis 50 ng für die verschiedenen Verbindungen. Mit dieser Methode wurden zahlreiche industriell hergestellte Trockengemüse untersucht und für die einzelnen Amadori-Verbindungen Gehalte zwischen 0,01% und 3,8% i. T. ermittelt. Besonders hohe Gehalte fanden sich bei Tomaten-, Gemüsepaprika- und Spargeltrockenprodukten, da hier in den Ausgangsprodukten relativ hohe Gehalte an Glucose und freien Aminosäuren als Vorstufen der Amadori-Verbindungen vorhanden sind.

Einleitung

Amadori-Verbindungen (1-Amino-1-desoxy-2-ketosen, Ketoseaminosäuren) entstehen im Frühstadium der Maillard-Reaktion durch Reaktion von Aldosen mit den Aminogruppen von Aminosäuren und Amadori-Umlagerung der hierbei gebildeten Aldosylaminosäuren. Sie stellen die ersten einigermaßen stabilen und analytisch faßbaren Produkte der Maillard-Reaktion dar; im weiteren Reaktionsverlauf werden sie zu einer Vielzahl von teilweise sensorisch sehr aktiven Folgeprodukten und schließlich zu Bräunungsprodukten (Melanoidine) abgebaut. Zusammenfassend wurde die Maillard-Reaktion u. a. von Hodge [1] und Baltes [2] behandelt. Ihr Verlauf ist in Abb. 1 stark vereinfacht dargestellt. Die Maillard-Reaktion spielt besonders bei der Trocknung von Gemüse und Obst sowie bei der Herstellung von Gemüse- und Obstkonzentraten und deren Lagerung eine erhebliche Rolle; bei der Prozeß- und Qualitätskontrolle der Lebensmittelindustrie muß daher auf diese Reaktion besonders geachtet werden. Zu drastische Trocknungsbedingungen und zu lange Lagerung führen zu gebräunten und sensorisch minderwertigen Produkten. Amadori-Ver-

* *Neue Anschrift:* Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt, Gutenbergstrasse 75, D-2300 Kiel, Bundesrepublik Deutschland

Offprint requests to: K. Eichner

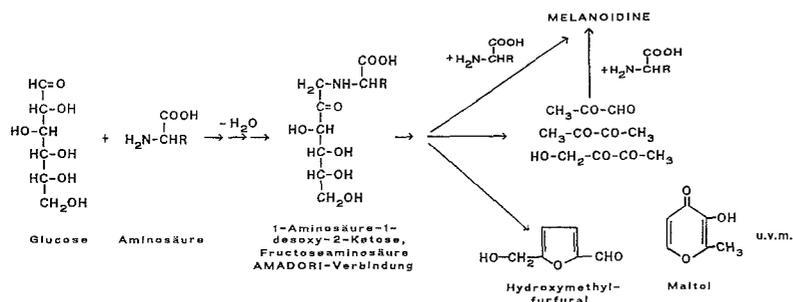


Abb. 1. Reaktionsverlauf der Maillard-Reaktion (nach [1, 2], stark vereinfacht)

bindungen können dabei zur Früherkennung derartiger, durch Maillard-Reaktion hervorgerufener Qualitätsveränderungen herangezogen werden, da sie im Gegensatz zur Bräunung ohne Induktionsperiode und vor dem Auftreten sensorischer Veränderungen gebildet werden [3]. Die Analyse der Amadori-Verbindungen erfolgte bisher fast ausschließlich mittels Aminosäureanalyse [3, 4], deren Aussagekraft aber unter der für Amadori-Verbindungen sehr schlechten Trennleistung sowie an der teilweise auftretenden Überlagerung mit Aminosäuren leidet, so daß nur Summenpeaks mehrerer überlagerter Verbindungen ausgewertet werden können. Mit guten Ergebnissen, auch für die Untersuchung von biologischen Proben, wurde vor kurzem der Einsatz der Capillar-GC der trimethylsilylierten Derivate von Amadori-Verbindungen vorgeschlagen [5]. Dieses Verfahren besitzt eine hohe Trennleistung und eine hohe Empfindlichkeit, erfährt aber die Amadori-Verbindungen der basischen Aminosäuren nicht.

Aufgrund der polaren Struktur und der relativ großen Stabilität der Amadori-Verbindungen sollte die HPLC eine aussichtsreiche Alternative zur Aminosäureanalyse und zur GC sein. Bisher wurden jedoch nur wenige HPLC-Verfahren für die Trennung von Amadori-Verbindungen beschrieben [6–8]; diese befassen sich aber lediglich mit der Analyse von Reinstoffen und Einzelkomponenten. Hauptgrund hierfür ist, daß bisher noch kein empfindliches und spezifisches HPLC-Detektionssystem für Amadori-Verbindungen existierte. Für einen spezifischen Nachweis von Amadori-Verbindungen soll in dieser Arbeit ihre Reduktionskraft in einer Nachsäulenreaktion mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), wobei dieses reaktiv zum rot gefärbten Triphenylformazan aufgespalten wird (s. Abb. 2), genutzt werden. Tetrazolium-

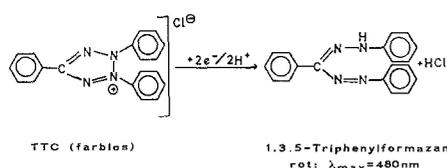


Abb. 2. Reduktionsindikator Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

salze wurden schon früh als DC-Sprühreagentien für Amadori-Verbindungen eingesetzt [9]. Auch die Verwendung als Nachsäulen-Reagens bei der HPLC reduzierender Zucker wurde beschrieben [10, 11].

Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien, Reagentien und Lösungsmittel, soweit nicht anders erwähnt, pro anal.-Qualität (Merck, Fluka).

Lösungsmittel/Chemikalien

Methanol über Iod und Magnesium destilliert, Acetonitril (zur Synthese) über P_2O_5 destilliert, Wasser über KMnO_4 destilliert, Pyridin über Ninhydrin destilliert, Diethylether, 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Ninhydrin, Trichloressigsäure, Essigsäure 100%, Kaliumdihydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat-dihydrat, Cellulose mikrokristallin (Serva), Ammoniak 2 mol/l.

Vergleichssubstanzen. Fructose, Glucose; Aminosäuren: γ -Abu (γ -Aminobuttersäure), Ala, Asp, AsN, Arg, Glu, Gln, Hyp, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Val.

Chromatographiesäulen für präparative und analytische Ionenaustauschchromatographie. I: Chromatographiesäule 4 cm i. D., 50 cm lang, mit Amberlite IR 120 H^+ , 20–50 mesh (Serva); Füllhöhe 25 cm. – II: Mitteldruckchromatographiesäule 2 cm i. D., 60 cm lang mit Verteilerstempel, gefüllt mit Aminex Q-150S, 7 μm , Pyridiniumform (Bio-Rad). – III: Chromatographiesäule 2 cm i. D., 50 cm lang, mit Lewatit MP 5080, 60–150 mesh, OH^- (Merck); Füllhöhe 25 cm. – IV: HPLC-Säule mit Vorsäule $(250+40) \times 4,6 \text{ mm}$ (Knauer), selbst befüllt mit DEAE-Si 100, 3 μ (Serva) in Slurry-Technik mit Isopropanol als Druckmittel, Fülldruck 450 bar.

Reagentien und Eluierlösungen.

Sprühreagens I: 0,5 g TTC in 100 ml Natronlauge (0,5 mol/l). – Sprühreagens II: 0,2 g Ninhydrin + 5 ml Essigsäure (10%) + 95 ml n-Butanol. – Lösungen von Trichloressigsäure in Wasser 0,1–1,5 mol/l; wäßrige Pyridin-Acetat-Puffer: Pyridin 0,3 mol/l, mit Essigsäure auf pH 3,6–5,2 einstellen; Fließmittel für die HPLC: Acetonitril/Phosphatpuffer 0,05 mol/l pH 5,8 (70+30/v+v); Reagens zur Nachsäulenreaktion: 3,5 g TTC/l Natronlauge (0,05 mol/l), unter Lichtausschluß membranfiltriert (0,45 μm) und in Braunglasflaschen aufbewahrt – bei Raumtemperatur einige Tage stabil.

Geräte

Trockenschrank; Gefriertrockner (z. B. GT 2, Leybold-Heraeus); Fraktionssammler; Vakuumrotationsverdampfer; Vakuumfiltrationsgerät mit Membranfiltern 0,2 μm Celluloseacetat Typ OE 66 (Schleicher & Schüll); pH-Einstabelektrode; Rotationsperforator

nach Ludwig Typ N 2070 Normag (O. Fritz GmbH, Hofheim/Taunus); Magnetrührer, Laborzentrifuge (z. B. Hereaeus-Christ); Filterspritze mit Swinny Filterhalter und Membranfilter 0,45 µm Typ HVLP 013 (Millipore); Schlagkreuzkaffeemühle. – Taumelkolbenpumpe (100 ml/h) mit Pulsdämpfer (RCT-FMI, Reichelt) zur Mitteldruckchromatographie; Probenaufgabeventil mit 5 ml Schleife (Laktek). – HPLC-Doppelkolbenpumpe Typ 750/04 (Knauer) mit TM-Pulsdämpfer (Biotronik); Schleifeninjektor 7125, 20 µl (Rheodyne); Nachsäulenderivatisierungseinheit URS 051 (Kratos); Reaktionscoils verschiedener Innenvolumina aus Tefloncapillare 0,3 mm i. D., 1,6 mm äußerer Durchmesser (Macherey/Nagel), nach dem Verfahren von Neue [12] selbst angefertigt und mit Durchflußmessungen geeicht; Wasserbadthermostat (z. B. N3, Haake); UV-VIS Spektralphotometer Typ 87.00 mit variabler Wellenlänge (Knauer); Schreiber mit Spiegeleinrichtung TY-2 (Knauer); Rechner-Integrator (z. B. CI-10, Milton Roy); Aminosäureanalysator LC 5001, Trennsäule BTC 2710 (Biotronik) mit Lithiumcitrat-Standardtrennprogramm für physiologische Flüssigkeiten [13].

Präparative Darstellung von Amadori-Verbindungen

Bei den hier dargestellten Amadori-Verbindungen handelt es sich ausschließlich um Fructoseamino-säuren (im folgenden als Fru-As abgekürzt) (Abb. 1).

a: Fru-Ala, Fru-Asp, Fru-AsN, Fru-Hyp, Fru-Ile, Fru-Leu, Fru-Phe, Fru-Pro, Fru-Ser, Fru-Thr, Fru-Val

60 mmol Glucose und 10 mmol der betreffenden Aminosäure in 600 ml wasserfreiem Methanol unter Rückfluß erhitzen, bis der Reaktionsansatz braun gefärbt ist (Reaktionszeiten Tabelle 1). Nach dem Abdestillieren des Methanols den Rückstand in Essigsäure (20%) lösen und die Lösung auf die mit Kationenaustauscher gefüllte Chromatographiesäule I aufgeben. Mit 2 l Wasser zuckerfrei waschen und die Eluate verwerfen. Anschließend die betreffende Amadori-Verbindung durch Elution mit Trichloressigsäure geeigneter Konzentration (Tabelle 1) von der Aminosäure trennen (Flußrate: 250 ml/h) und das Eluat mittels eines Fraktionssammlers auffangen (Volumen der Einzelaktionen: 20 ml). Die erhaltenen Fraktionen jeweils parallel durch Tüpfeltests auf Chromatographiepapier mit Sprühreagens I (5 min Raumtemperatur/Lichtausschluß, Amadori-Verbindungen lachsfarbig) und Sprühreagens II (5 min 105 °C, Amadori-Verbindungen und Aminosäuren violett) untersuchen. Fraktionen, die mit beiden Reagentien positiv reagieren, vereinigen und im Rotationsperforator mit Ether von Trichloressigsäure befreien; die Lösung anschließend mit Aktivkohle entfärben und zur Trockene eindampfen (Vakuumsrotationsverdampfer). Durch Aufnehmen in Methanol und tropfenweise Zugabe von Ether die Amadori-Verbindungen fällen. Mehrfaches Umfällen liefert die reinen Verbindungen.

b: Fru-γ-Abu, Fru-Arg, α-Fru-Lys, ε-Fru-Lys, α,ε-Difru-Lys

Wäßrige Lösungen von Glucose (60 mmol) und der betreffenden Aminosäure (10 mmol) mit 40 g Cellulosepulver zu einem dicken Brei verrühren; das Gemisch gefriertrocknen, anschließend durch Lagerung über einer gesättigten CaCl₂-Lösung im Exsikkator auf einen a_w-Wert von 0,35 einstellen und bei 40 °C in dicht verschlossenen Gefäßen lagern (Lagerzeit s. Tabelle 1). Den Reaktionsansatz danach 3mal mit je 200 ml Wasser extrahieren, den Extrakt mit 10 ml Essigsäure ansäuern und auf die Chromatographiesäule I geben. Die Säule zuckerfrei waschen, dann die Amadori-Verbindung und nicht umgesetzte Aminosäure mit 500 ml Ammoniak eluieren. Das Eluat zur Trockene einengen (Vakuumsrotationsverdampfer, Wasserbad 35 °C) und im betreffenden Pyridin-Acetat-Puffer (Tabelle 1) aufnehmen. Die gebildete Amadori-Verbindung an einem stark sauren Hochleistungskationenaustauscher (Mitteldrucksäule II) von der nicht umgesetzten Aminosäure abtrennen. Die einzelnen Fraktionen wie bei a untersuchen, entsprechend vereinigen und am Vakuumro-

Tabelle 1. Reaktions- und Isolierungsbedingungen zur Darstellung von Amadori-Verbindungen (TCE = Trichloressigsäure, Py-Ac = Pyridin-Acetat)

Verbindung	Reaktionszeit (h)	TCE-Konzentration (mol/l)	Verbindung	Lagerzeit bei 40 °C (Tage)	pH-Wert des Py-Ac-Puffers
Fru-Asp	7	0,05	Fru-γ-Abu	14	3,6
Fru-Thr	5	0,10	α,ε-Difru-Lys	9	4,0
Fru-Hyp	8	0,15	α-Fru-Lys	9	4,0
Fru-Ser	5	0,15	ε-Fru-Lys	9	4,0
Fru-AsN	5	0,15	Fru-Arg	14	4,0
Fru-Pro	4,5	0,20			
Fru-Ala	2,5	0,20			
Fru-Val	3	0,20			TCE-Konzentration (mol/l)
Fru-Leu	3,5	0,25			
Fru-Ile	3,5	0,25			
Fru-Phe	2,5	0,40			
			Fru-Glu	14	0,10/1,5
			Fru-GIN	7	1,5

tationsverdampfer zur Trockene einengen. Durch wiederholtes Aufnehmen in Wasser und Einengen zur Trockene letzte Pyridinacetatspuren entfernen. Fällern und Umkristallisieren der einzelnen Amadori-Verbindungen wie unter a beschrieben.

c: Fru-Glu

Die Synthese analog b durchführen, den Reaktionsansatz aber vor der Gefriertrocknung mit Natronlauge auf pH 7.5 einstellen. Nach der Lagerung (Dauer: Tabelle 1) analog Verfahren b auf die Chromatographiesäule I aufgeben, zuckerfrei waschen und anschließend mit Trichloressigsäure (0,1 mol/l) fraktionieren. Im Vorlauf erscheinende Fraktionen, die nur mit TTC reagieren und durch säurekatalysierte Cyclisierung von Fru-Glu entstandene Fructosepyrrolidincarbonsäure (Fru-Py) enthalten, aufbewahren. Alle Fraktionen, die mit TTC und Ninhydrin im Tüpfeltest positiv reagieren, vereinigen und im Rotationsperforator mit Ether unter Eiskühlung von Trichloressigsäure befreien. Die extrahierte Lösung auf 50 ml einengen, mit 2 ml Essigsäure ansäuern, erneut auf die regenerierte Säule I aufgeben und mit Wasser waschen. In diesem Eluat befindet sich der überwiegende Anteil der in der bisherigen Aufarbeitung gebildeten Fru-Py, Fru-Glu und restliche Spuren von Fru-Py mit 500 ml Trichloressigsäure (1,5 mol/l) schnell eluieren und die Eluate sofort unter Eiskühlung im Rotationsperforator von Trichloressigsäure befreien. Anschließend mit Aktivkohle entfärben und am Vakuumrotationsverdampfer (Wasserbad 30 °C) zur Trockene einengen. Durch Aufnehmen in Methanol und Zugabe von Ether Fru-Glu ausfällen und durch mehrfaches Umfällen reinigen.

d: Fru-GIN

Die Synthese und Extraktion wie bei Fru-Glu beschrieben durchführen. Den Extrakt mit Natronlauge auf pH 7 einstellen und auf die Anionenaustauschersäule III aufgeben. Mit Wasser zuckerfrei waschen und anschließend mit 500 ml Trichloressigsäure (1,5 mol/l) fraktionieren. Die im Tüpfeltest mit TTC und Ninhydrin positiv reagierenden Fraktionen vereinigen und sofort wie bei Fru-Glu beschrieben aufarbeiten. Das erhaltene Endprodukt enthält ca. 60% Fru-GIN, ca. 20% GIN und jeweils geringe Anteile an Fru-Py, Fru-Glu und Glu.

e: Fru-Py (Fructosepyrrolidincarbonsäure)

Die bei der Isolierung von Fru-Glu anfallenden Mutterlauge und Fru-Py enthaltenden Fraktionen (s. o.) vereinigen, zur vollständigen Umwandlung geringer Mengen noch vorhandener Fru-Glu in Fru-Py 30 min bei 90 °C erhitzen und anschließend durch Perforation mit Ether von Trichloressigsäure befreien. Die extrahierte Lösung auf

pH 7 einstellen und auf die Chromatographiesäule III geben. Mit Wasser waschen und danach Fru-Py mit 350 ml Trichloressigsäure (1,5 mol/l) eluieren. Die Eluate durch Perforation mit Ether von Trichloressigsäure befreien, auf 50 ml einengen und mit 10 g Amberlite IR 120 H⁺ zur Bindung freigesetzter Aminosäure versetzen. Nach kurzem Stehen abfiltrieren und am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene einengen. Nach Aufnehmen in Isopropanol durch Etherzugabe Fru-Py fällen und durch Umfällen weiter reinigen.

Aufarbeitung von Trockengemüseprodukten

5,00 g feingemahlene bzw. pulverförmige Gemüseproben in einem 200-ml-Meßkolben mit ca. 150 ml Wasser versetzen und 30 min unter Rühren mit dem Magnetrührer extrahieren. Danach mit Wasser auffüllen und scharf zentrifugieren. Vom Zentrifugat 1–10 ml mit Methanol/Wasser (65 + 35, v/v) auf 50 ml auffüllen und mittels Filterspritze membranfiltrieren. Von der klaren Lösung 20 µl für die HPLC-Trennung einsetzen.

Arbeitsbedingungen für die HPLC

Flußrate analytische Pumpe 1,5 ml/min; Flußrate Reagenspumpe für die Nachsäulenreaktion 0,5 ml; Reaktionscoil 1,0 ml Innenvolumen, zur Temperierung in eine Wasserbad bei 85 °C einlegen; Detektor 480 nm, 0,08–0,32. AUFS; Schreiber 1 cm/min.

Ergebnisse und Diskussion

Darstellung der Vergleichssubstanzen

Da Amadori-Verbindungen nicht käuflich erhältlich sind, mußten sie für die durchzuführenden Untersuchungen selbst hergestellt werden. Außer für die Derivate von Glutaminsäure und Glutamin konnten bekannte Methoden [3, 14, 15] nach einigen Modifizierungen eingesetzt werden. Die Erhitzung von Glucose und Aminosäuren in absolutem Methanol führt bei rechtzeitigem Reaktionsabbruch (Tabelle 1) zu recht einfach zu reinigenden Reaktionsgemischen. Für die Umsetzungen mit basischen Aminosäuren und mit Glutaminsäure und Glutamin sind diese Reaktionsbedingungen zu drastisch. Hier werden die Reaktionspartner auf den inerten Träger Cellulose aufgezogen und bei 40 °C und kontrolliertem Wassergehalt gelagert. Die nach beiden Verfahren erhältlichen Extrakte können an stark sauren Kationenaustauschern bzw. an Anionenaustauschern gereinigt werden. Zucker und andere neutrale Reaktionsprodukte werden mit Wasser entfernt. Bei der sich anschließenden Fraktionierung werden die Amadori-Verbindungen bei der Elution mit Trichloressigsäure oder mit Pyridin-Acetatpuffern vor den betreffenden Aminosäuren eluiert. Bei der Umsetzung von Glucose mit Lysin entstehen drei verschiedene Amadori-Verbindungen, die nur durch Pyridin-Acetatpuffer getrennt werden können und in der Reihenfolge α,ϵ -Difru-Lys, α -Fru-Lys und ϵ -Fru-Lys eluiert werden [16].

Für die Gewinnung der Amadori-Verbindungen von Glutaminsäure und Glutamin konnten keine bestehenden Verfahren angewandt werden, da bei allen

bekanntesten und getesteten Methoden [3, 7, 14] Produkte erhalten wurden, die Fructosepyrrolidincarbonsäure (Fru-Py), z. T. sogar als Hauptkomponente, enthielten. Dieses Nebenprodukt entsteht durch Cyclisierung, besonders unter den sauren Isolierungsbedingungen, aus Fru-Glu und Fru-GIN. Bisher existieren zu dieser Verbindung nur wenig Hinweise [7, 15, 17], da sie mit Ninhydrin als Farbreagens bei den bisher üblichen Trenn- und Nachweisverfahren (DC, Aminosäureanalyse) nicht erfaßt wird. Auch die Reaktivität gegenüber alkalischer TTC-Lösung bei Raumtemperatur ist gegenüber den übrigen Amadori-Verbindungen deutlich niedriger. Um die Bildung von Fru-Py möglichst zu unterdrücken, sind daher alle Arbeiten mit Rohextrakten zügig und ohne Einwirkung von Wärme durchzuführen. Ebenso sind alle chromatographischen Trennungen und die Trichloressigsäureextraktionen schnell auszuführen, um die Standzeiten der sauren Lösungen so kurz wie möglich zu halten. Für Fru-GIN konnte trotzdem nur ein angereichertes Produkt erhalten werden; da diese Verbindung bereits auf der Kationenaustauschersäule in hohem Maße zu Fru-Py cyclisiert, mußte auf diesen für die Reinigung sehr wirksamen Schritt verzichtet werden.

Die Charakterisierung und Reinheitsprüfung der unter a–e erhaltenen Amadori-Verbindungen erfolgte zum einen durch Capillar-GC-MS der Trimethylsilylderivate nach der Methode von Wittmann [5], zum anderen durch Aminosäureanalyse [3] und durch HPLC mit Nachsäulenderivatisierung. Die Reinheit der einzelnen Verbindungen lag – mit Ausnahme von Fru-GIN – zwischen 95% und 99,3%.

Bedingungen für die Nachsäulenreaktion von Amadori-Verbindungen

Mit Ausnahme der Amadori-Verbindungen aromatischer Aminosäuren besitzt diese Verbindungsklasse keine chromophoren Gruppen und ist daher mittels UV-Detektion nur im Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 210 nm mit geringer Empfindlichkeit nachweisbar. Die Umsetzung von Amadori-Verbindungen mit dem Reduktionsindikator Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in alkalischer Lösung führt zu einem intensiv rot gefärbten Formazan (Abb. 2), das bei 480 nm mit hoher Empfindlichkeit bestimmt werden kann. Das Ausmaß dieser Farbreaktion ist stark von der Alkalität des Reaktionsgemisches sowie von der Reaktionszeit und -temperatur abhängig. Die Optimierung der Reaktionsbedingungen ist im folgenden dargestellt. Die optimale Reagenszusammensetzung wurde in Vorversuchen ermittelt. Es zeigte sich, daß alle Amadori-Verbindungen bei 0,05 *m*-NaOH im Reagens maximale Farbausbeuten lieferten. Nur für Fru-Py und die reduzierenden Zucker Fru und Glc lag

das Optimum zwischen 0,075 und 0,1 mol/l. Die TTC-Konzentration wurde für alle Untersuchungen auf 3,5 g/l Reagenslösung eingestellt, da hier ein Plateau der Farbausbeute in Abhängigkeit von der TTC-Konzentration vorliegt.

Bei Raumtemperatur ist eine alkalische TTC-Lösung ein sehr spezifisches Reagens auf Amadori-Verbindungen. Für den Einsatz als Nachsäulen-Reagens muß zur Reaktionsbeschleunigung bei erhöhter Temperatur gearbeitet werden, wobei dann auch reduzierende Zucker miterfaßt werden. Dazu wird der Reaktor (=Coil) in einen Wasserbadthermostaten gelegt. Die Abhängigkeit der Farbausbeuten einiger ausgewählter Verbindungen von der Reaktionstemperatur zeigt Abb. 3. Alle Amadori-Verbindungen haben ihr Maximum bei 85–95 °C. Fru-Py und reduzierende Zucker benötigen etwas höhere Temperaturen. Bemerkenswert ist, daß α,ϵ -Difru-Lys eine fast doppelt so hohe molare Farbausbeute liefert wie α - und ϵ -Fru-Lys. Dies kann als Bestätigung für das Vorhandensein der zweiten reduzierenden Fructosegruppe im Molekül gewertet werden.

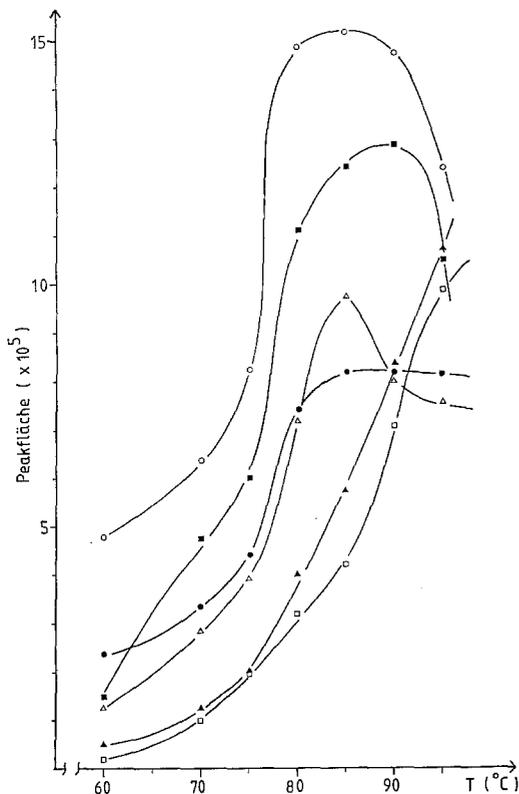


Abb. 3. Abhängigkeit der Farbausbeute (Peakfläche) bei der Reaktion einiger Amadori-Verbindungen (je 2 nmol absolut) mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) von der Temperatur [Reaktor-(Coil)-Volumen: 1,0 ml; Flußrate Säuleneluat + Reagenslösung: 2,0 ml/min]. — □ = Glc, ■ = Fru-Ser, △ = Fru-AsN, ▲ = Fru-Py, ○ = α,ϵ -Difru-Lys, ● = α -Fru-Lys)

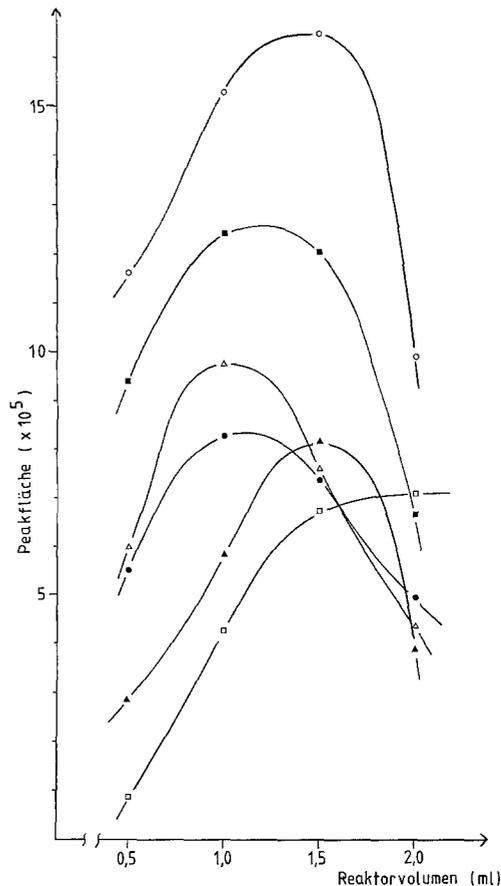


Abb. 4. Abhängigkeit der Farbausbeute (Peakfläche) bei der Reaktion einiger Amadori-Verbindungen mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) von der Reaktionszeit bei 85 °C – Bedingungen und Zuordnungen der Kurven: siehe Abb. 3

Die Abhängigkeit der Farbausbeute von der Reaktionszeit ist für einige Verbindungen in Abb. 4 dargestellt. Die Reaktionszeit konnte durch das Innenvolumen der Reaktionscoils gesteuert werden. Durch die Verwendung selbst angefertigter Spiralen konnten beliebige Volumina eingesetzt werden. Aus allen Untersuchungen zu den Reaktionsbedingungen läßt sich erkennen, daß die Amadori-Verbindungen ihre höchsten Farbausbeuten jeweils unter etwas milderen Bedingungen erreichen als Fructose, Glucose und Fructosepyrrolidoncarbonsäure.

Trennung von Amadori-Verbindungen mittels HPLC

Zur Trennung einiger Amadori-Verbindungen hatte Takeoka [6] eine Kieselgelphase mit chemisch gebundenen primären Aminogruppen verwendet. Mit sauren Acetonitril/Wassergemischen wirkten die protonierten Aminogruppen als schwache Anionenaustauscher. Wesentlich bessere Trennleistungen ließen sich nach eigenen Untersuchungen an stark basischen Anionenaustauschern auf der Basis modifizierten Kie-

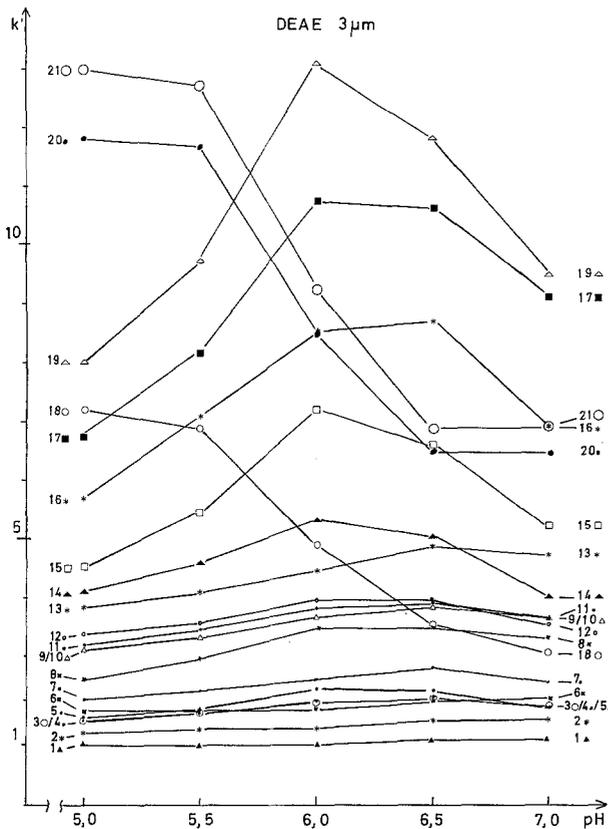


Abb. 5. Abhängigkeit der k' -Werte an DEAE 3 μ m Material vom pH-Wert des im Fließmittel eingesetzten Phosphatpuffers; 1 Fru; 2 Glc; 3 Fru-Leu; 4 Fru-Ile; 5 Fru-Phe; 6 Fru-Pro; 7 Fru-Val; 8 Fru-Hyp; 9/10 Fru-Ala + Fru-Gln; 11 Fru-AsN; 12 Fru-Thr; 13 Fru- γ -Abu; 14 Fru-Ser; 15 Fru-Arg; 16 α -Fru-Lys; 17 ϵ -Fru-Lys; 18 Fru-Py; 19 α,ϵ -Difru-Lys; 20 Fru-Glu; 21 Fru-Asp

selgels mit tertiären und quaternären Aminogruppen erzielen. Von den untersuchten Anionenaustauschern zeigte DEAE-Kieselgel (3 μ) (Serva) die besten Trennleistungen. Etwas schlechtere Ergebnisse lieferte Nucleosil SB (5 μ) (Macherey/Nagel). Als Elutionsmittel diente Acetonitril/Phosphatpuffergemische mit einem Anteil von 70 Vol-% Acetonitril, da nur hiermit die in den untersuchten pflanzlichen Trockenprodukten in größeren Mengen enthaltenen reduzierenden Zucker Fructose und Glucose ausreichend getrennt werden konnten. Höhere Acetonitrilgehalte im Fließmittel ergeben für alle untersuchten Verbindungen sehr lange Retentionszeiten. Die Retentionszeiten und die Elutionsreihenfolge der Amadori-Verbindungen hingen sehr stark vom pH-Wert des eingesetzten Puffers ab. In Abb. 5 ist die Abhängigkeit der k' -Werte der einzelnen Verbindungen vom Puffer-pH-Wert dargestellt ($k' = t_r - t_0 / t_0$; t_r = Retentionszeit der jeweiligen Verbindung, t_0 = Totzeit der Trennsäule). Der Grund für die starke pH-Abhängigkeit der k' -Werte der Fructoseamino-säuren dürfte an ihrem unterschiedlichen Ionisationsgrad liegen. Bei pH 5,0 weisen die sauren

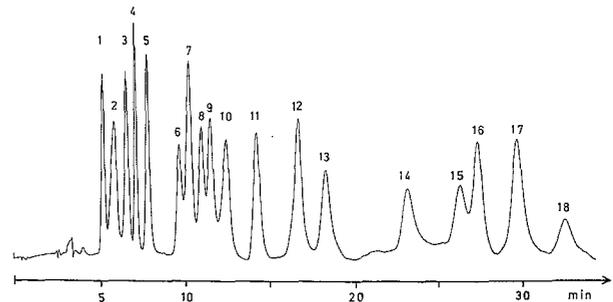


Abb. 6. Analyse eines Standardgemisches von Amadori-Verbindungen sowie Fructose und Glucose durch HPLC und Nachsäulenderivatisierung mit TTC; HPLC-Bedingungen (s. Text). 1 Fru; 2 Glc; 3 Fru-Leu; 4 Fru-Phe; 5 Fru-Val; 6 Fru-Hyp; 7 Fru-Ala + Fru-Gln; 8 Fru-AsN; 9 Fru-Thr; 10 Fru- γ -Abu; 11 Fru-Ser; 12 Fru-Py; 13 Fru-Arg; 14 α -Fru-Lys; 15 ϵ -Fru-Lys; 16 Fru-Glu; 17 Fru-Asp; 18 α,ϵ -Difru-Lys

Amadori-Verbindungen Fru-Asp und Fru-Glu die höchsten k' -Werte auf, da bei diesem pH-Wert offenbar nur sie eine größere negative Überschußladung aufweisen, während dies bei den basischen Amadori-Verbindungen (Fru-Arg, α - und ϵ -Fru-Lys, α,ϵ -Difru-Lys) noch nicht der Fall ist. Dies führt zu dem starken Anstieg der k' -Werte für basische Amadori-Verbindungen bei Erhöhung des pH-Wertes, da sie mit steigender negativer Ladung fester gebunden werden, während gleichzeitig die erhöhte Elutionskraft zu einer schnelleren Elution der sauren Amadori-Verbindungen führt. Oberhalb pH 6,0 bzw. 6,5 übertrifft die ansteigende Elutionskraft des Fließmittels den durch die Zunahme der negativen Ladung der basischen Amadori-Verbindungen zunächst erzielten Effekt, so daß diese wieder schneller eluiert werden. Auf die Trennung der Zucker und der übrigen Amadori-Verbindungen scheinen die genannten Effekte im untersuchten pH-Bereich nur einen geringen Einfluß zu haben. Bei pH 5,8 ließen sich an der DEAE-Säule fast alle zur Verfügung stehenden Amadori-Verbindungen sowie Fructose und Glucose isokratisch trennen (Abb. 6). Das Paar Fru-Leu/Fru-Ile kann nur knapp getrennt werden, Fru-Ile ist der Übersichtlichkeit halber daher nicht im Standardgemisch enthalten. Fru-Ala und Fru-Gln konnten unter keinen Bedingungen getrennt werden. Für die quantitative Bestimmung wurden diese Paare daher jeweils gemeinsam erfaßt und als Fru-Leu bzw. Fru-Gln berechnet. Die Nachweisgrenzen der einzelnen Amadori-Verbindungen lagen zwischen 10 ng und 50 ng, die einzelnen Eichkurven waren im Konzentrationsbereich bis 7500 ng/Injektion linear.

Extraktion und Reinigung von Gemüseproben

Für die Isolierung von Amadori-Verbindungen aus Gemüseproben hat sich die Extraktion mit kaltem

Wasser mit anschließender Fällung von Proteinen und wasserlöslichen Polysacchariden durch Zugabe von Methanol bewährt. Eine weitergehende Reinigung der Extrakte erwies sich als unnötig, da die Nachsäulen-Reaktion mit TTC so spezifisch ist, daß bei keiner der untersuchten Gemüseproben Matrixstörungen auftraten. Dies konnte durch Untersuchungen von Frischgemüseproben und von im Labor ohne Wärmeeinwirkung gefriergetrockneten Gemüseblindproben bestätigt werden. Eine in der Literatur [5, 14, 15] mehrfach vorgeschlagene Reinigung und Konzentrierung der wäßrigen Extrakte durch Fixierung der Amadori-Verbindungen an stark sauren Kationenaustauschern (s. auch präparative Isolierung), Abtrennung der Zucker und Neutralstoffe durch Waschen mit Wasser und die anschließende Elution mit Trichloressigsäure verfälschte die Ergebnisse sogar erheblich. Fru-Py taucht nämlich fast quantitativ im wäßrigen Vorlauf auf und die Gehalte an Fru-Glu und Fru-GIN nehmen während der Fixierung am Kationenaustauscher und der anschließenden sauren Elution unter Cyclisierung zu Fru-Py deutlich ab.

Ergebnisse der Untersuchungen an Gemüseproben

Bisher liegen aus der Literatur nur einige durch Aminosäureanalyse erzielte und somit wenig aussagekräftige Untersuchungen über die Zusammensetzung und die Menge der in pflanzlichen Trockenprodukten vorkommenden Amadori-Verbindungen vor [3, 18, 19]. Um einen Überblick zu erhalten, wurde daher eine größere Anzahl industriell hergestellter Trockengemüse mit der beschriebenen Methode untersucht. Die Abb. 7 und 8 zeigen zwei typische Chromatogramme. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen wiedergegeben. Je nach Aminosäurezusammensetzung der einzelnen Gemüsearten sowie den Trocknungs- und Lagerungsbedingungen ergeben sich un-

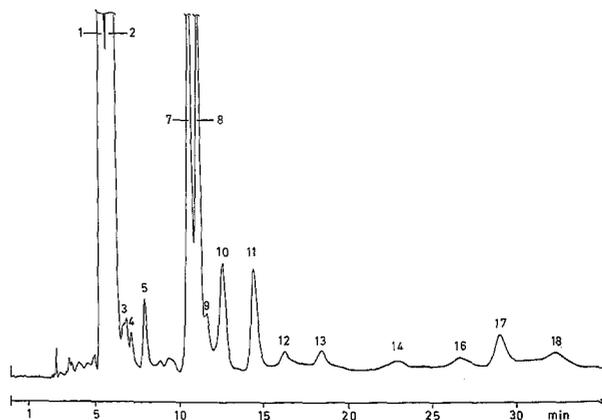


Abb. 7. HPLC-Chromatogramm (Detektion: Nachsäulenderivatisierung mit TTC) eines Extraktes von getrocknetem grünem Gemüsepaprika; Bedingungen und Zuordnung der Peaks s. Abb. 6

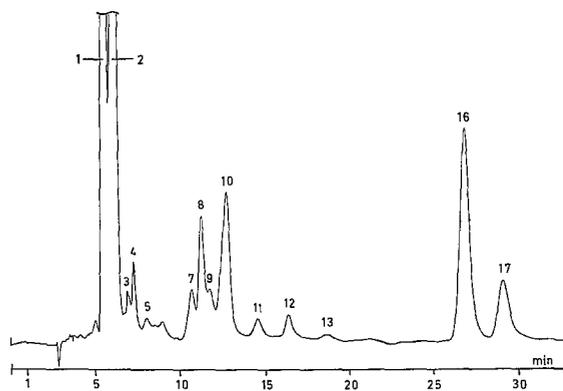


Abb. 8. HPLC-Chromatogramm (Detektion: Nachsäulenderivatisierung mit TTC) eines Extraktes von walzengetrocknetem Tomatenpulver; Bedingungen und Zuordnung der Peaks s. Abb. 6

terschiedliche Gehalte der einzelnen Amadori-Verbindungen im Endprodukt. So zeigten Tomatenprodukte besonders hohe Gehalte an Fru-Glu, Fru-Asp und Fru- γ -Abu. Bei den übrigen Gemüsearten überwiegen

Tabelle 2. Gehalt an Amadori-Verbindungen in verschiedenen industriell hergestellten Trockengemüsen (mg/100 g TM)

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Fru-Leu + Fru-Ile	81,2	158	41,2	60,7	36,7	165	65,7	142	59,3	290	79,3	24,5	127	28,2	50,1
Fru-Phe	277	150	108	232	89,8	62,9	75,0	56,7	22,3	149	37,5	14,7	7,0	19,5	31,7
Fru-Val	80,1	41,9	47,9	46,3	27,2	155	84,9	35,1	12,2	175	25,0	39,3	8,3	33,8	47,3
Fru-Thr	285	368	189	384	129	427	79,7	108	41,2	0	13,5	17,8	20,1	20,6	0
Fru-GIN + Fru-Ala	3110	494	516	517	205	2794	508	364	132	1296	313	397	280	418	413
Fru-AsN	780	945	513	740	334	2967	1333	1086	430	2436	451	127	84,9	115	285
Fru- γ -Abu	2069	1462	1044	1445	532	490	347	212	72,3	347	16,2	105	109	76,0	41,6
Fru-Ser	167	127	68,6	146	64,3	324	104	55,6	18,2	192	57,3	74,6	21,9	17,4	35,3
Fru-Py	1086	594	2148	771	735	309	132	88,1	103	131	0	43,7	122	30,4	26,8
Fru-Arg	92,0	150	0	109	180	247	115	199	0	438	40,0	111	0	81,6	0
Fru-Glu	2886	3788	676	1725	533	57,6	84,6	36,6	36,7	126	86,3	88,5	0	51,8	265
Fru-Asp	1009	948	659	721	328	300	172	61,8	48,2	74,3	108	55,3	33,4	34,1	70,0

I Tomatenflocken, luftgetrocknet; II, III Tomatenpulver, walzengetrocknet; IV Tomatenpulver, heiß sprühgetrocknet; V Tomatenpulver, kalt sprühgetrocknet; VI Gemüsepaprika, gefriergetrocknet; VII Gemüsepaprika, luftgetrocknet; VIII Gewürzpaprika, edelsüß; IX Rosenpaprika, scharf; X Spargel, luftgetrocknet; XI Spargel, gefriergetrocknet; XII Blumenkohl, luftgetrocknet; XIII Lauch, luftgetrocknet; XIV Karotte, luftgetrocknet; XV Sellerie, luftgetrocknet

dagegen Fru-AsN und Fru-GlN (mit Fru-Ala). Zunächst sehr überraschend war der z. T. sehr hohe Gehalt an Fru-Py bei Tomaten- und Gemüsepaprikaprodukten im Vergleich zu anderen Gemüsearten. Dies kann dadurch erklärt werden, daß der pH-Wert wäßriger Extrakte von Tomaten- und Gemüsepaprikaschoten bei allen untersuchten Proben im Bereich zwischen pH 4,0 und pH 4,8 lag, während er sich bei den übrigen Gemüsearten zwischen pH 5,5 und pH 5,9 bewegte. Offensichtlich fördert dieser niedrigere pH-Wert bereits deutlich die Cyclisierung von Fru-Glu und Fru-GlN zu Fru-Py im Verlauf der Trocknung und der anschließenden Lagerung.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, daß die vorgestellte HPLC-Methode sehr gut zur Bestimmung von Amadori-Verbindungen geeignet und der bisher eingesetzten Aminosäureanalyse durch die erheblich verbesserte Trennleistung, die hohe Spezifität und die deutlich verkürzte Analysenzeit weit überlegen ist. Erstmals konnten so zahlreiche Gemüsetrockenprodukte auf ihren tatsächlichen Gehalt an Amadori-Verbindungen und auf den Gehalt des Cyclisierungsproduktes Fru-Py untersucht werden.

Die Untersuchungen wurden im Rahmen der industriellen Gemeinschaftsforschung über die Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen e.V. (AIF) aus Mitteln des Bundesministers für Wirtschaft gefördert. Hierfür sei an dieser Stelle verbindlich gedankt.

Literatur

1. Hodge JE (1953) *J Agric Food Chem* 1:928-943
2. Baltes W (1980) *Lebensmittelchem Gerichte Chem* 34:39-47
3. Ciner-Doruk M, Eichner K (1979) *Z Lebensm Unters Forsch* 168:9-20
4. Noguchi M, Satoh Y, Nishida K, Andoh S, Tamaki E (1971) *J Agric Biol Chem* 35:65-70
5. Wittmann R (1986) Dissertation Universität Münster
6. Takeoka GR, Coughlin JR, Russel GF (1978) In: Charalambous I (ed) *Liquid chromatographic analysis of foods and beverages*, vol 1. Academic Press, New York San Francisco London, pp 179-214
7. Roeper H, Roeper S, Heyns K (1983) *Carbohydr Res* 116:183-195
8. Moll N, Gross B (1983) *Instrum Anal Food* 1:279-301
9. Anet EFLJ, Reynolds TM (1957) *Aust J Chem* 10:182-197
10. D'Amboise M, Noel D, Hanai T (1980) *Carbohydr Res* 79:1-10
11. Wight AW, van Niekerk PJ (1983) *Food Chem* 10:211-224
12. Neue U-D (1976) Dissertation Universität Saarbrücken
13. Handbuch zum Aminosäureanalysator LC 5001 (1985) Fa Bionik, Maintal
14. Abrahms A, Lowy PH, Borsook H (1955) *J Am Off Anal Chem* 63:1074
15. van den Ouweland GAM, Peer HG, Tjan SB (1978) In: Charalambous I (ed) *Flavor of food and beverages: Chem Technol Proc Conf*. Academic Press, New York, pp 131-143
16. Eichner K (1975) In: Duckworth RB (ed) *Water relations of foods*. Academic Press, London New York San Francisco, pp 417-434
17. Heyns K, Paulsen H (1959) *Liebigs Ann Chem* 622:160-174
18. Tomita H, Noguchi M, Tamaki E (1965) *J Agric Biol Chem* 29:515
19. Yamamoto K, Noguchi M (1973) *J Agric Biol Chem* 37:2185-2187

Eingegangen am 7. Juni 1988