

CHROM. 20 981

MAILLARD-REAKTION VON RINDERSERUMALBUMIN MIT GLUCOSE HOCHLEISTUNG-FLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS DES 2-FORMYL-5-(HYDROXYMETHYL)PYRROL-1-NORLEUCINS NACH ALKALISCHER HYDROLYSE

MANFRED SENGL, FRANZ LEDL und THEODOR SEVERIN*

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Sophienstrasse 10, 8000 München 2 (F.R.G.)

(Eingegangen am 11. Mai 1988; geänderte Fassung eingegangen am 11. August 1988)

SUMMARY

Maillard reaction of bovine serum albumin with glucose. Determination of 2-formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrole-1-norleucine by high-performance liquid chromatography after alkaline hydrolysis

Reactions between glucose and bovine serum albumin proceed predominantly at the side chain amino groups of lysine residues. Among other products, protein-bound 2-formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrole-1-norleucine is formed. After alkaline hydrolysis and fractionation of the protein hydrolysate on RP-18 material this substance can be separated by high-performance liquid chromatography. The identity of the norleucine derivative with a synthesized compound can be determined with fast atom bombardment-mass spectrometry spectral data. A colour reaction with thiobarbituric acid is also suitable for detection.

EINLEITUNG

Erhitzt man reduzierende Zucker mit Aminosäuren oder Proteinen, so tritt rasch Bräunung ein und es entstehen eine grosse Anzahl verschiedenartiger Produkte (Maillard-Reaktion)¹. Derartige Umsetzungen sind vor allem in erhitzten oder länger gelagerten Lebensmitteln von Bedeutung (Bräunung, Bildung von Röstaromen). Auch unter physiologischen Bedingungen reagieren Zucker, wenn auch langsamer, mit Proteinen. Bei einer Reihe von Eiweiss-Verbindungen wie Hämoglobin², Albumin³, Kollagen⁴, Augenlinsenprotein⁵ und Erythrozytenmembranprotein⁶ wurden nichtenzymatische Glycosylierungsreaktionen nachgewiesen. Derartige Vorgänge treten verstärkt bei Diabetikern auf⁷. Man diskutiert auch, ob Alterungsvorgänge mit Protein-Zucker-Reaktionen verbunden sind.

Aminosäuren addieren sich leicht an Glucose zu Glycosylaminen, die in einer Amadori-Umlagerung in die entsprechenden N-substituierten 1-Desoxy-1-amino-fructosen übergehen. Durch Folgereaktionen kommt es zur Bildung zahlreicher Heterocyclen.

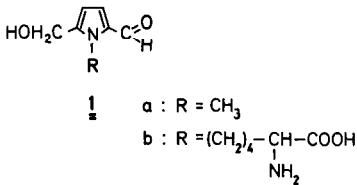


Fig. 1. N-substituierte 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrole.

Sowohl in der Lebensmittelchemie wie auch in der medizinischen Chemie sucht man Methoden zum Nachweis der Maillard-Reaktion. Für das Anfangsstadium sind Amadori-Verbindungen charakteristisch; sie sagen jedoch wenig über den Umfang von Folgereaktionen aus.

Erhitzt man Glucose oder Fructose mit Methylamin in neutraler oder schwach saurer, wässriger Lösung, so ist aus dem Produktgemisch 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)-1-methylpyrrol (**1a** in Fig. 1) in verhältnismässig grosser Menge isolierbar⁸. Analoge Verbindungen wurden mit anderen primären Aminen oder Aminosäuren erhalten⁹⁻¹¹. Von besonderem Interesse ist das Norleucin-Derivat **1b**, da bei Umsetzungen von Zuckern mit Proteinen bevorzugt die Aminogruppe der Lysinseitenketten angegriffen wird. Diese Verbindung wurde aus einer Glucose-Lysin-Reaktionsmischung isoliert¹² und auf unabhängigem Wege synthetisiert¹³. Es wurde berichtet, dass **1b** mutagene¹⁴ und enzymhemmende Eigenschaften¹⁵ besitzt.

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte man davon ausgehen, dass auch im proteingebundenen Lysin die ϵ -Aminogruppe bei der Umsetzung mit Glucose teilweise zum Formyl-hydroxymethylpyrrol reagiert. Wir haben analytische Verfahren zum Nachweis von **1b** in Proteinen ausgearbeitet. Es zeigte sich, dass das Pyrrol-Derivat **1b** nach alkalischer Spaltung des Proteins hochdruckflüssigchromatographisch (HPLC) nachweisbar ist. Auch eine Farbreaktion mit Thiobarbitursäure brachte gute Ergebnisse.

EXPERIMENTELLES

Geräte

Das HPLC-System bestand aus einer L-6000 Pumpe, einem L-4000 UV-Detektor (gemessen wurde bei 296 nm) und einem D-2000 Integrator (alle Merck-Hitachi) sowie einem 7125 Loop Injektor (Rheodyne). Die folgenden Säulen und mobilen Phasen wurden verwendet: (1), LiChrosorb RP-18 (Merck, 10 μm , 250 \times 10 mm I.D.), 0,1 M Triethylammoniumformiat-Methanol (9:1, v/v), 2 ml/min; (2), LiChrosorb RP-18 (Bischoff, 10 μm , 250 \times 8 mm I.D.), Wasser-Acetonitril (9:1, v/v), 2 ml/min; (3), LiChrosorb RP-18 (Bischoff, 5 μm , 250 \times 4,6 mm I.D.), Eluent wie (1), 1 ml/min.

Für die Niederdruckchromatographie wurde eine 6000-A Pumpe (Waters) und eine LiChroprep RP-18 Säule [Merck, 40-63 μm , 0,1 M Triethylammoniumformiat-Methanol (8:2, v/v), 4 ml/min] kombiniert und ein 2112 Redirac Fraktionssammler (LKB, 450 Tropfen je Fraktion) angeschlossen. Zur Aminosäuretrennung stand ein 4400 Gerät (LKB) zur Verfügung, die Säule (295 \times 4 mm I.D.) war mit Ultro Pac-8 gefüllt. Temperaturen: $T_1 = 45^\circ\text{C}$, $T_2 = 56^\circ\text{C}$, $T_3 = 73^\circ\text{C}$; Eluenten: 0,1 mol Natri-

um-Citrat puffer, $\text{pH}_1 = 3,20$, $\text{pH}_2 = 4,25$ und $\text{pH}_3 = 6,45$ (+ 1,0 mol Natriumchlorid). Detektion erfolgte nach Anfärben mit Ninhydrin bei 440 und 570 nm.

Dünnschichtchromatographische (DC) Trennungen wurden mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, 0,2 und 0,5 mm) durchgeführt. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, 40–63 μm) verwendet.

Die colorimetrische Bestimmung erfolgte mit einem PMQ II Spektralphotometer (Zeiss). Das FAB-MS wurde mit einem HSQ 30 Massenspektrometer (Stossgas Argon, 8 kV, 400 A) mit Datensystem SS 300 (Finnigan/MAT) aufgenommen.

Zur Messung von NMR-Spektren stand ein Varian 60-A Instrument und ein Jeol GSX 400 Gerät zur Verfügung (Tetramethylsilan als innerer Standard).

Herstellung des Pyrrolaldehyds **1b**

Eine Menge von 3,4 g N^z-Acetyllysin^{16–18} (18 mM) wurde mit 0,9 g Glucose-Monohydrat (4,5 mM) in 60 ml Ethanol unter Zugabe von 20 Tropfen Eisessig gemischt und die Suspension 24 h unter Rückfluss gerührt. Anschließend wurde filtriert und der Rückstand wieder in 60 ml Ethanol suspendiert und nach Zugabe von 15 Tropfen Eisessig und 0,8 g Glucose-Monohydrat wie oben umgesetzt. Dieses Verfahren wurde insgesamt 4 Mal durchgeführt. Die gesammelten, konzentrierten Filtrate wurden über eine Kieselgelsäule [beginnend mit dem Gemisch Ethylacetat–Methanol (2:1, v/v) und mit steigender Menge Methanol) fraktioniert. In einer mit Ester–Methanol (2:3, v/v) eluierten Fraktion liess sich die Hauptmenge an acetyliertem **1b** nachweisen. [DC-Kontrolle mit Ester–Methanol (2:3, v/v) ein UV-detektierbarer Fleck mit $R_F = 0,5$ wurde nach Besprühen mit einer Dinitrophenylhydrazin-Lösung rostbraun.] Die Ausbeute an acetyliertem Rohprodukt betrug ca. 300 mg. ¹H-NMR (C²H₃O²H, 60 MHz): δ 1,7 (m, 6H), 2,0 (s, 3H), 4,3 (m, 3H), 4,7 (s, 2H), 6,3 (d, 1H), 7,0 (d, 1H), 9,45 (s, 1H).

Die Abspaltung der Acetylgruppe erfolgte nach zwei Methoden: (A) 150 mg Rohprodukt wurden mit 4 ml 2,5 M Bariumhydroxyd-Suspension 40 h unter Rückfluss erhitzt, ungelöstes Bariumhydroxyd abfiltriert, mit 1 M Schwefelsäure neutralisiert und ausgefallenes Bariumsulfat abfiltriert. Der Rückstand des Filtrats wurde schichtchromatographisch (0,5 mm) mit 4:1:1 Acetonitril–Ethanol–Wasser (4:1:1, v/v) getrennt ($R_F = 0,2$, Ninhydrinreaktion) und mit heissem Methanol aus der Zone eluiert (Ausbeute ca. 10 mg). (B) 150 mg Rohprodukt wurden in 7 ml Phosphatpuffer (pH = 8,0) aufgenommen und mit 100 mg Acylase (aus *Aspergillus species*, Sigma) 36 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung von **1b** erfolgte über HPLC (Säule 2, Retentionszeit $t_R = 11,0$ min).

1b: ¹H-NMR (²H₂O, 400 MHz): δ 1,3 (m, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,75 (m, 2H), 3,6 (t, 1H), 4,15 (t, 2H), 4,6 (s, 2H), 6,25 (d, 1H), 7,0 (d, 1H), 9,2 (s, 1H). MS (FAB): 255 (84%, M + 1), 237 (56), 175 (100), 148 (74), 84 (88).

Derivat **1b** (6 mg) wurde in 1 l Wasser gelöst. Davon wurde 1 ml entnommen, mit 2 ml Thiobarbitursäure (0,025 M in 1 M Phosphorsäure gelöst) und Wasser im Messkolben auf 10 ml aufgefüllt, 30 min auf 75°C erhitzt und nach dem Abkühlen sofort bei 456 nm gegen eine Blindprobe gemessen; $E - E_0 = 0,12$.

Von der Stammlösung (6 mg/l) wurde 1 ml entnommen, konzentriert und in wenig Citrat puffer (pH 2,2) aufgenommen. Nach Injektion von 100 μl in den Aminosäureanalysator wurde ein Peak nach 41,2 min erhalten.

Aus der Stammlösung wurde 1 ml abpipettiert und mit dem Eluenten der Säule 3 auf 10 ml aufgefüllt. Die HPLC-Analyse (Säule 3) ergab einen Peak nach 18,26 min.

Umsetzung von Rinderserumalbumin mit Glucose und Bestimmung des Pyrrolaldehyds **1b**

Wässrige Lösungen (25 ml) von 1,82 g Rinderserumalbumin (Serva) und 2,5 g Glucose (Merck) wurden 4 Wochen bei pH 5 (Citratpuffer) auf 37°C bzw. 3 Wochen bei pH 7 (Phosphatpuffer) auf 50°C erwärmt. Die Proteinlösungen wurden anschließend 72 h gegen destilliertes Wasser dialysiert, das Wasser unter reduziertem Druck weitgehend entfernt und der verbliebene Rückstand bei 0,1 Torr getrocknet. Eine Menge von 200 mg des so erhaltenen Proteins wurden in 45 ml 5 M Natronlauge 16 h bei 121°C im evakuierten Autoklaven erhitzt, die Lösung mit Salzsäure neutralisiert, filtriert und konzentriert. Das Konzentrat wurde mit 0,1 M Triethylammoniumformiat-Methanol (8:2, v/v) auf 60 ml verdünnt und jeweils 5 ml über die Niederdrucksäule fraktioniert. Derivat **1b** konnte in den Fraktionen 16, 17 und 18 nachgewiesen werden [DC-Kontrolle, Acetonitril-Ethanol-Wasser (4:1:1, v/v), UV-Detektion und Ninhydrinreaktion, $R_F = 0,2$]. Der Rückstand aus den vereinigten Fraktionen wurde an Säule 1 des HPLC-Systems aufgetrennt ($t_R = 26,5$ min, t_R Tryptophan = 24,9 min) und die bei 26,5 min eluierte Verbindung gesammelt (mehrmalige Injektion, aufgetrennt wurde das Hydrolysat von ca. 200 mg Protein).

Zur Absicherung der Identität und der Konzentration wurden folgende Bestimmungen durchgeführt (dazu wurde jeweils 1/5 der gesammelten Substanz eingesetzt).

(1) Bei der Farbreaktion mit Thiobarbitursäure (siehe Herstellung des Pyrrolaldehyds **1b**) wurde eine Extinktionsdifferenz von 0,15 gemessen, entsprechend einer Menge von 7,5 μg **1b** in 40 mg Protein (3 Wochen auf 50°C erhitzt). Daraus ergibt sich bei einem Gehalt von 10% Lysin im Rinderserumalbumin, dass ca. eine von tausend Lysinseitenketten reagiert hat. Bei der auf 37°C erhitzten Probe liess sich keine auswertbare Extinktionsdifferenz ermitteln.

(2) Die Probe (ca. 40 mg, 3 Wochen auf 50°C erhitzt) wurde in 10 ml des Eluenten der Säule 3 gelöst. Die HPLC-Bestimmung (Säule 3) von **1b** ergab einen Peak nach 18,26 min aus dessen Grösse sich ein Gehalt von ca. 7 μg **1b** abschätzen liess (Vergleich mit der Stammlösung, siehe Bestimmung des Pyrrolaldehyds **1b**). Die auf 37°C erhitzte Probe wurde in 1 ml des Eluenten gelöst. Die HPLC-Analyse ergab einen Gehalt von ca. 0,9 μg **1b** in 40 mg Protein.

(3) Das FAB-MS-Spektrum zeigte die für Verbindung **1b** charakteristischen Massenfragmente (gemessen wurde mit der MS-MS-Technik).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

2-Formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrol-1-norleucin (**1b**) ist durch Umsetzung von Glucose mit Lysin nur in schlechter Ausbeute erhältlich und schwer zu reinigen. Miller und Olsson¹³ konnten diese Verbindung aus 2,5-Diformylpyrrol und 6-Brom-2-acetylamino-capronsäure in einer Reihe von Reaktionsschritten darstellen. Wir haben N^α-Acetyllysin mit Glucose erhitzt und aus der Reaktionsmischung das N^α-Acetyl-Derivat von **1b** isoliert, aus dem die Acetylgruppe enzymatisch leicht abspaltbar ist.

Beim Nachweis von **1b** in Proteinen kann man die übliche Säurehydrolyse nicht vornehmen, da unter diesen Bedingungen der Pyrrolring zerstört wird. Bei alkalischer Spaltung der Peptidbindungen bleibt jedoch der Pyrrolkern weitgehend unverändert.

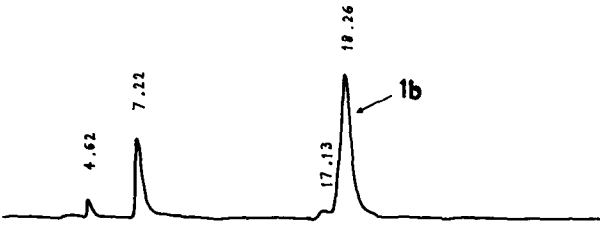


Fig. 2. HPLC-Bestimmung von vorgereinigtem **1b** mit einer 5- μ m RP-18-Säule (UV-Detektion bei 296 nm). Retentionszeit in min.

Die zunächst versuchte gaschromatographische-Bestimmung der Aminosäure **1b** brachte kein positives Ergebnis. Eine saure Veresterung ist aus den genannten Gründen nicht möglich. Silylierung von **1b** führte unter den von uns angewandten Bedingungen nicht zu einem gaschromatographisch erfassbaren Derivat¹⁹.

Mit HPLC lässt sich das Norleucin-Pyrrol **1b** im Gemisch mit den übrigen Aminosäuren gut bestimmen. Bei einer Vorreinigung über eine Niederdruck-RP-18-Säule erhält man **1b** in einer Fraktion gemeinsam mit Tryptophan. Auf einer semi-präparativen RP-18-Säule mit Ammoniumformiat puffer lassen sich **1b** und Tryptophan gut trennen. Die Bestimmung von **1b** erfolgt schliesslich auf einer analytischen Säule unter ähnlichen Bedingungen (Fig. 2). Bei einer Trennung der Aminosäuren auf einer Ionenaustauschersäule unter den üblichen standardisierten Bedingungen (Anfärbung mit Ninhydrin) erscheint **1b** an der gleichen Stelle wie Phenylalanin. Fraktioniert man jedoch vorher wie oben beschrieben auf einer RP-18-Säule, so ist Phenylalanin abgetrennt und man kann anschliessend die Bestimmung auch auf einem Ionenaustauscher vornehmen (Fig. 3). Schliesslich lässt sich **1b** nach einer HPLC-Vorfractionierung auch durch eine Farbreaktion mit Thiobarbitursäure nachweisen. Dabei erfolgt eine Kondensation an der Formylgruppe des Pyrrolringes. Die Reaktion ist daher nur spezifisch, solange andere Carbonylgruppen nicht vorliegen.

Um die Bildung von **1b** im Protein nachzuweisen, haben wir Rinderserumalbumin mit Glucose bei 50°C sowie 37°C 3 bzw. 4 Wochen reagieren lassen, also die Maillard-Reaktion bei relativ niedrigen Temperaturen durchgeführt. Nach der Dialyse wurde die höhermolekulare Fraktion alkalisch hydrolysiert. Die chromatogra-

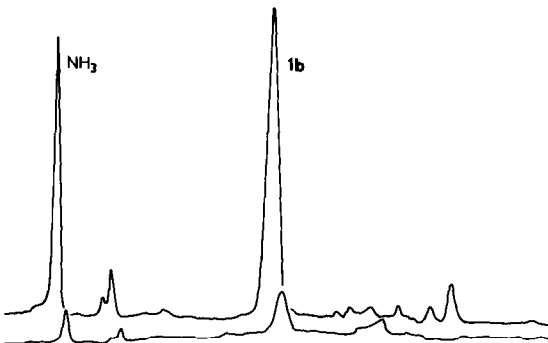


Fig. 3. Aminosäureanalyse von **1b** unter Standardbedingungen. Obere Linie: 570 nm, unter Linie: 440 nm.

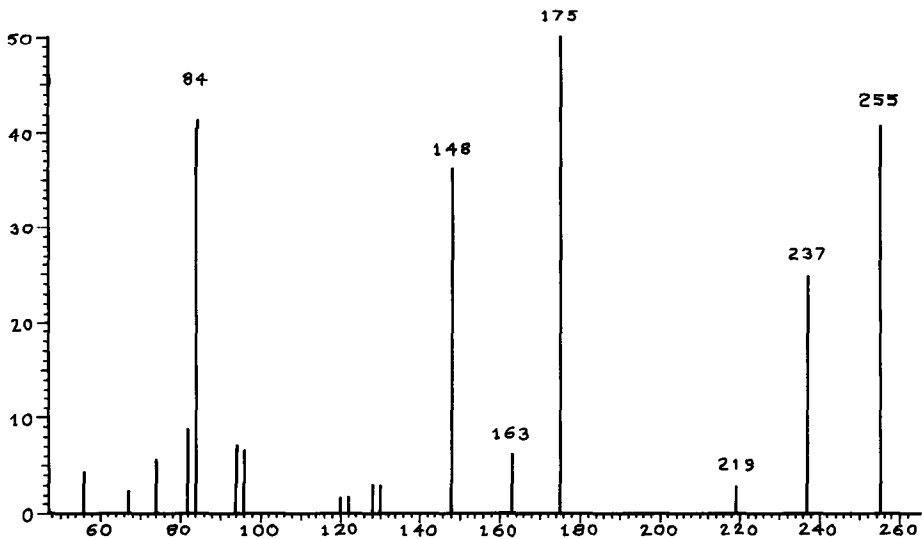


Fig. 4. FAB-MS von **1b**.

phische Trennung der Hydrolyseprodukte erfolgte in der Reihenfolge RP-Niederdrucksäule, semipräparative RP-Säule und analytische RP-Säule. Die Identität der abgetrennten Verbindung mit dem Pyrrolaldehyd **1b** wurde mit der FAB-MS-MS-Methode überprüft (Fig. 4). Das dabei erhaltene Spektrum war identisch mit dem der synthetisierten Verbindung **1b**.

Durch Vergleich der Peakhöhen bekannter Konzentrationen an synthetisiertem **1b** mit der des isolierten Produkts (analytische Säule) liess sich die Menge des aus der Protein-Glucose-Reaktion gebildeten Pyrrolaldehyds **1b** abschätzen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass der Lysinanteil im Rinderserumalbumin *ca.* 10% beträgt. Für das auf 37°C erhitzte Rinderserumalbumin ergab sich demnach, dass mehr als eine von zehntausend ϵ -Aminogruppen reagierten. Bei der höher erhitzten Probe war es *ca.* eine von tausend Seitenketten des Lysins.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Reaktion von Rinderserumalbumin mit Glucose findet überwiegend mit den Aminogruppen der Lysinseitenketten statt. Neben anderen Produkten bildet sich proteingebundenes 2-Formyl-5-(hydroxymethyl)pyrrol-1-norleucin. Nach alkalischer Spaltung und Auftrennung des Proteinhydrolysats an RP-18-Material kann diese Substanz isoliert werden. Die Identität des Norleucinderivats mit einer synthetisierten Verbindung lässt sich mit dem FAB-MS-Spektrum überprüfen. Zusätzlich kann die Farbreaktion mit Thiobarbitursäure zum Nachweis herangezogen werden.

LITERATUR

- 1 H. Paulsen und K. Pflughaupt, in W. Pigman und D. Horton (Herausgeber), *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, New York, 1980, S. 881.

- 2 R. J. Koenig, S. H. Blobstein und A. Cerami, *J. Biol. Chem.*, 252 (1977) 2992.
- 3 J. F. Day, S. R. Thorpe und J. W. Baynes, *J. Biol. Chem.*, 254 (1979) 595.
- 4 S. P. Robins und A. J. Bailey, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48 (1972) 76.
- 5 V. J. Stevens, C. A. Rouzer, V. M. Monnier und A. Cerami, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75 (1978) 2918.
- 6 J. A. Miller, E. Gravallesse und H. F. Bunn, *J. Clin. Invest.*, 65 (1980) 896.
- 7 B. W. Vogt, E. D. Schleicher und O. H. Wieland, *Diabetes*, 31 (1982) 1132.
- 8 G. R. Jurch und J. H. Tatum, *Carbohydr. Res.*, 15 (1970) 233.
- 9 K. Olsson, P. A. Pernemalm und O. Theander, *Acta Chem. Scand. B*, 32 (1978) 249.
- 10 F. Hayase und H. Kato, *Agric. Biol. Chem.*, 49 (1985) 467.
- 11 F. G. Njoroge, M. S. Lawrence und V. M. Monnier, *Carbohydr. Res.*, 167 (1987) 211.
- 12 T. Nakayama, F. Hayase und H. Kato, *Agric. Biol. Chem.*, 44 (1980) 1201.
- 13 R. Miller und K. Olsson, *Acta Chem. Scand. B*, 39 (1985) 717.
- 14 H. Omura, N. Jahan, K. Shinohara und H. Murakami, *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, 215 (1984) 537.
- 15 R. E. Öste, R. Miller, H. Sjöström und O. Noren, *J. Agric. Food Chem.*, 35 (1987) 938.
- 16 A. Neuburger und F. Sanger, *Biochem. J.*, 37 (1943) 515.
- 17 H. Zahn, H. Huber, W. Ditscher, D. Wegerle und J. Meienhofer, *Chem. Ber.*, 89 (1956) 407.
- 18 P. M. Hardy, A. C. Nicholls und H. N. Rydon, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1 (1976) 958.
- 19 H. Frank, in W. Fresenius, H. Günzler, W. Huber und G. Tölg (Herausgeber), *Analytiker-Taschenbuch, Band 4*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1st ed., 1984, p. 337.