

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science (MSc)

im Studiengang Biochemie und molekulare Biomedizin

am Institut für Biochemie, TU Graz

Proteinspezifischer Gehalt von N^ε- Carboxymethyllysin in Milch und Milcherzeugnissen

vorgelegt von

Nina Krisper

2014

Danksagung

Hiermit möchte ich mich recht herzlich bei Herrn

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Michael Murkovic

für die nette Aufnahme in den Arbeitskreis und die wissenschaftliche Betreuung im Laufe meiner Masterarbeit bedanken.

Weiters bedanke ich mich ebenso bei allen Mitarbeitern des Institutes sowie den netten Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Auch bei meiner Familie und Freunden möchte ich mich für die Rücksichtnahme und seelische Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit bedanken.

Darüber hinaus gilt ein besonderer Dank meinen Eltern, deren Unterstützung mir dieses Studium erst ermöglichte.

Zusammenfassung

Die Herstellung von handelsüblichen Milch- und Milcherzeugnissen erfordert ein Durchlaufen einiger Aufbereitungs- und Herstellungsverfahren. In erster Linie wird das Verfahren von mäßig bis großer Hitzeeinwirkung geprägt, was ebenso Konsequenzen mit sich bringen kann. In diesem Prozess finden Reaktionsabläufe statt, unter anderem die Maillard-Reaktion. Hier sorgen reduzierende Zucker in Kombination mit Aminosäuren für Veränderungen in Lebensmitteln, wie beispielsweise eine Braunfärbung im Laufe der Erhitzung oder die Bildung von flüchtigen Aroma- und Farbstoffen.

Über drei Phasen dieses Reaktionsablaufes kommt es vorerst zur Bildung sogenannter Amadori-Produkte und weiter zu „Advanced Glycosylation Endproducts (AGE)“, wie auch N^ε-Carboxymethyllysin eines ist. N^ε-Carboxymethyllysin (CML) gilt als guter Marker für starke Hitzeeinwirkung und somit als Indikator für chemisch modifiziertes Lysin in Milch.

Verschiedene, handelsübliche Milcherzeugnisse sollen auf dessen Gehalt an CML untersucht und rückführend auf die jeweilige Behandlungsart bezogen analysiert werden. Hierbei wurden demnach Produkte unterschiedlicher Behandlungsart gewählt. Unterschiedliche Erhitzungsverfahren sowie Ergänzung anderer Zusatzstoffe wurden miteinbezogen.

Geeignete Methoden zur Probenaufbereitung sowie für den anschließenden Analysevorgang mussten ermittelt werden, wofür zahlreiche Versuchsdurchläufe und Tests aufkommen mussten. Nach vollzogener Reduktion, Präzipitation, Hydrolyse und schließlich Derivatisierung mittels Dansylchlorid wurden die Proben anhand Reversed-Phase – HPLC analysiert. Aufgrund der geringen Konzentrationen von CML in den Proben erfolgte die Detektion nach Derivatisierung über einen Fluoreszenzdetektor, der aufgrund seiner hohen Sensitivität weitverbreiteten Gebrauch findet.

Abstract

The production of commercial milk and dairy products requires a passage through some treatment and manufacturing processes. In the first instance, such sort of method is influenced by moderate to intense impact of heat, which may also bring consequences. In this process, reaction processes take place, including the Maillard reaction. Here, reducing sugars in combination with amino acids lead to changes in food, such as a browning over the time of heating or the formation of volatile flavors and colorings.

Across three phases of this reaction process, there foremost occurs the formation of so-called Amadori products which goes further to "Advanced Glycosylation End products (AGE)," as also N^ε-Carboxymethyllysine is one of them. N^ε-Carboxymethyllysine (CML) is considered a good marker of exposure to excessive heat and thus as an indicator of degraded lysine in milk.

Various commercially available milk products are to be examined for its content of CML and analyzed in respective to their particular type of treatment. Therefore, products which underwent different types of treatments were selected. Different heating methods as well as additions of other additives were included.

Suitable methods for sample preparation and for the subsequent analysis process had to be determined, for which numerous experimental runs and tests had to pay. On completion of the reduction, precipitation, hydrolysis and derivatization using dansyl chloride, finally, the samples were analyzed with the help of reversed-phase - HPLC. Due to the low concentrations of CML in the samples the detection took place by means of a fluorescence detector, which finds widespread use due to its high sensitivity.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 1. EINLEITUNG | 8 |
| 1.1 Zusammensetzung von Milch | 8 |
| 1.2 Erhitzen von Milch | 11 |
| 1.3 Konsequenzen | 13 |
| 1.3.1 Herabsetzung der ernährungsphysiologischen Qualität von Milchproteinen aufgrund „blockierten“ Lysins | 13 |
| 1.3.2 Verlust von Vitaminen und Mineralstoffen | 13 |
| 1.3.3 Entstehung antioxidativer und antibakterieller Kompo- nenten..... | 14 |
| 1.3.4 Entstehung von Aromastoffen und brauner Färbung | 14 |
| 1.3.5 Krankheitserregende Effekte | 15 |
| 1.4 Maillard-Reaktion | 16 |
| 1.4.1 Prinzip | 16 |
| 1.4.2 N ^ε -Carboxymethyllysin..... | 18 |
| 1.4.2.1 Synthesewege von N ^ε -Carboxymethyllysin | 19 |
| 1.4.2.2 N ^ε -Carboxymethyllysin in Milcherzeugnissen..... | 20 |

| | |
|---|-----------|
| 1.4.2.3 Nε-Carboxymethyllysin als Marker im menschlichen Körper | 21 |
| 1.5 Zielsetzung | 23 |
| 2. MATERIALIEN UND METHODEN | 24 |
| 2.1 Analysevorbereitungen | 24 |
| 2.1.1 ausgewählte Proben | 24 |
| 2.1.2 verwendete Materialien | 26 |
| 2.1.3 Aufbereitung der Proben | 27 |
| 2.1.3.1 Reduktion | 29 |
| 2.1.3.2 Präzipitation | 29 |
| 2.1.3.3 Hydrolyse | 30 |
| 2.1.3.4 Derivatisation | 30 |
| 2.2 Analyse mittels RP-HPLC | 33 |
| 2.2.1 Prinzip | 33 |
| 2.2.2 Zusammensetzung des Laufmittels | 35 |
| 2.2.3 Untersuchungsparameter | 35 |
| 2.2.4 Standard-Kalibrationsgerade | 37 |
| 2.2.5 Chromatogramm des Standards | 38 |

| | |
|---|----|
| 3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 39 |
| 3.1 Probenaufbereitung | 39 |
| 3.1.1 Reduktion | 39 |
| 3.1.2 Präzipitation..... | 41 |
| 3.1.3 Hydrolyse | 41 |
| 3.1.4 Derivatisation..... | 45 |
| 3.2 Analyse mittels RP-HPLC | 49 |
| 3.3 Probenauswertung | 49 |
| 3.3.1 Ermittlung der Ergebnisse..... | 51 |
| 3.3.2 Vergleich der Ergebnisse..... | 57 |
| 4. SCHLUSSBETRACHTUNG | 61 |
| 5. LITERATURVERZEICHNIS | 62 |

1. Einleitung

Milch gilt als ein vielseitig verwertbares und nährstoffreiches Lebensmittel. Vor allem als Calciumlieferant ist es sehr beliebt und bekannt. Nicht zu vergessen sind hierbei auch der Gehalt an Vitaminen, ungesättigten Fettsäuren sowie das Milcheiweiß, was für eine hohe biologische Wertigkeit der Milch und deren Milchprodukte steht. Schon in Form von Muttermilch dient sie als Hauptnahrungsquelle für Säuglinge, welche für das Wachstum und die Entwicklung alle wichtigen Nährstoffe enthält. Weiters ermöglichen technologische Verfahren es, Milch in unterschiedlichste Milcherzeugnisse weiterzuverarbeiten, wie zum Beispiel Butter, Joghurt oder Käse. Neben Kuhmilch werden auch Ziegen- oder Schafsmilch für jeglichen Konsum sowie für die Herstellung weiterer Milchprodukte verwendet. Auch in Form von Pulver wird für Milch Verwendung gefunden, sei es als Kaffeeweißer, Nahrungsergänzungsmittel für Säuglinge oder aber auch für industrielle Weiterverarbeitung in anderen Lebensmitteln, wie zum Beispiel Schokolade.

1.1 Zusammensetzung von Milch

Unter „Milch“ wird hauptsächlich Kuhmilch verstanden und darf auch nur als Milch von Kühen bezeichnet werden, Ziegen- oder Schafmilch muss deutlich gekennzeichnet werden. Ausgangsstoffe wie Glukose oder Aminosäuren werden mit dem Blut in die Milchdrüsen des Euters transportiert, woraus folglich Milch produziert wird. Als „Fett-in-Wasser“-Emulsion bezeichnet erhält die Milch ihre weiße Farbe aus Fett- und Proteinkolloide, die in Form von Tröpfchen in der Milch vorliegen. Werden jene entfernt, ändert sich die Färbung der dadurch entstehenden Molke aufgrund des Lactoflavin- und β -Carotingehaltes in eine gelbgrünliche Farbe. Ihr Geschmack kann aufgrund falscher Fütterung [Winzenried, 1955] oder Krankheit der Tiere verändert werden, während der Geruch unspezifisch ist.

Der Hauptbestandteil in der Kuhmilch beansprucht das Wasser mit einen Anteil von ca. 87 %, gefolgt von Kohlenhydraten, Fett, Proteinen, Mineralstoffen als auch Vitaminen, Enzymen und verschiedenen anderen, stickstoffhaltigen Substanzen (Tab. 1) [Baltes et al., 2011].

Tab. 1: Hauptbestandteile der Kuhmilch [Baltes et al., 2011]

| Bestandteil | Menge [%] |
|--------------------|------------------|
| Proteine | 3,4 |
| Fett | 3 – 5 |
| Kohlenhydrate | 4,8 |
| Mineralstoffe | 1 |

Die Milchproteine werden in 76 – 86 % Casein und 14 – 24 % Molkenprotein unterteilt. Casein bindet Phosphorsäure über die Aminosäure Serin. Es kann durch elektrophoretische Auftrennung in hauptsächlich drei Fraktionen aufgetrennt werden: α -Casein, welches weiters noch in α_{S1} - und α_{S2} -Casein untergliedert wird, β -Casein und κ -Casein [Farrell et al., 2004]. Calciumkomplexe gewähren einen Zusammenhalt aller Fraktionen (Abb. 1). Weiters werden die Molkenproteine aus Albuminen (α -Lactalbumin) und Globulinen (β -Lactoglobulin A, B) zusammengesetzt, worunter auch Proteine aus dem Blut der Kuh miteinbegriffen sind, wie Blutserum-Albumin und Immunoglobuline.

Ebenso zählen Proteasen und andere Enzyme wie Lysozym, Amylase, alkalische Phosphatase und Katalase zu den Proteinen in der Kuhmilch [Shahani et al., 1973]. Die hitzeempfindliche alkalische Phosphatase kann beispielsweise als Indikator für Kurzzeiterhitzung dienen, wobei die Katalase Eutererkrankungen in der Milch anzeigt.

Der Fettgehalt und die Fettzusammensetzung in der Milch unterscheiden sich nach Rasse und Jahreszeit. Niederlandvieh gibt größere Mengen an fettärmerer Milch, während Hochlandvieh fettreichere Milch, aber weniger davon liefert. Das Fett in der Milch liegt wie bereits erwähnt in Form von Fettröpfchen mit einem Durchmesser von 1 – 22 μm vor und sind von einer Schicht aus Phospholipiden, etwas Cholesterin und β -Carotin umgeben [Baltes et al., 2011]. variieren

Zu den nachgewiesenen 60 Fettsäuren im Milchfett zählen unter anderem die Triacylglyceride, welche in unterschiedlicher Länge in gesättigter und ungesättigter Form als Großteil zu 95 % in Milchfett vorliegen. Des Weiteren besteht es auch noch zu 2 % aus Diacylglyceride, 1 % Phospholipide und zu je weniger als 0,5 % aus Cholesterin und 0,5 % freien Fettsäuren [Haug et al., 2007].

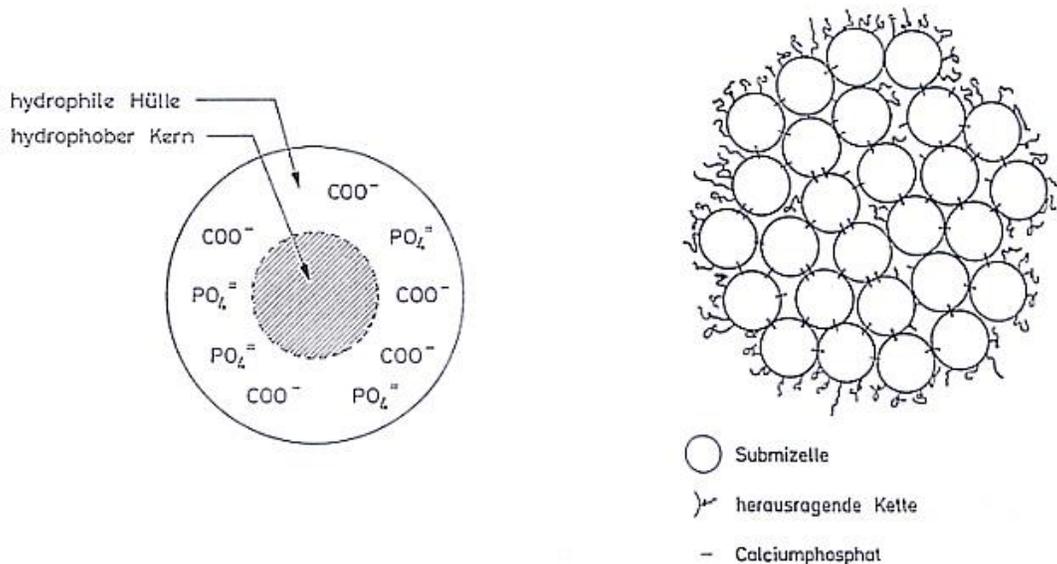


Abb. 1: Schematisches Modell einer Caseinmicelle. Links: Submizelle, rechts: Micelle aus Submicellen, die durch Calciumphosphat verbunden sind [Mikulle, 2003]

Den Kohlenhydratanteil übernimmt zur Gänze die Laktose mit 4,8 %, auch Milchzucker genannt. Diese kann leicht aus der Molke isoliert werden und liegt sowohl in α - als auch in β -Form vor. Sie findet weite Verbreitung in Nahrungs- und Arzneimitteln. Bei geringem Konzentrationsverhältnis zu Natriumchlorid kann Laktose in der Milch als Indikator für Eutererkrankungen dienen, da hierbei der Milchzuckergehalt erniedrigt vorliegt und im Gegenzug die Natriumchlorid-Konzentration ansteigt.

Zu den vorkommenden Mineralstoffen zählen Calcium, Kalium und Natrium. 40 g Calcium sowie fast 40 g Phosphor werden über die Milch von einer Kuh pro Tag umgesetzt, wobei je 20 % davon an Casein gebunden ist. Zahlreiche Spurenelemente und Vitamine, wie Vitamin A und sämtliche wasserlöslichen Vitamine, sind ebenso in der Kuhmilch enthalten [Baltes et al., 2011].

Kuhmilch unterscheidet sich von der Milch anderer Säugetiere vor allem in deren Fett- und Proteingehalt. Vergleiche verschiedener Milcharten sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Zusammensetzung verschiedener Milcharten in % [Baltes et al., 2011]

| Herkunft | Trockenmasse | Fett | Gesamtprotein | Casein | Molkenprotein | Lactose | Asche |
|----------|--------------|------|---------------|--------|---------------|---------|-------|
| Kuh | 12,7 | 3,7 | 3,4 | 2,8 | 0,6 | 4,8 | 0,7 |
| Mensch | 12,4 | 3,8 | 1,0 | 0,4 | 0,6 | 7,0 | 0,2 |
| Ziege | 13,2 | 4,5 | 2,9 | 2,5 | 0,4 | 4,1 | 0,8 |
| Schaf | 19,3 | 7,4 | 5,5 | 4,6 | 0,9 | 4,8 | 1,0 |
| Esel | 8,5 | 0,6 | 1,4 | 0,7 | 0,7 | 6,1 | 0,4 |
| Stute | 11,2 | 1,9 | 2,5 | 1,3 | 1,2 | 6,2 | 0,5 |

Zu den Milcherzeugnissen zählen unter anderem Buttermilch, Sauermilch und Sauermilchprodukte, Joghurt, Kefir, Kondensmilch und Milchpulver. Sie werden mittels unterschiedlicher Verfahren aus dem Ausgangsprodukt Milch erhalten; von bakterieller Säuerung über Zusetzen bakterieller Kulturen, Erhitzungsschritte bis hin zu Zentrifugations- und Eindampfverfahren [Baltes et al., 2011].

1.2 Erhitzen von Milch

Rohmilch kann in unbehandelter Form Krankheitserreger wie EHEC-Stämme von *E. coli*, Listerien und Salmonellen übertragen [Keweloh et al., 2006]. Erhitzungsverfahren dienen nicht nur dazu, Rohmilch mittels thermischer Inaktivierung bestimmter Enzyme länger haltbar zu machen, sondern auch jene vor allem für Kleinkinder gefährlichen, krankheitserregenden Keime abzutöten.

Beispiele solcher Verfahren sind die Pasteurisierung, Hoch- und Ultrahecherhitzung (UHT) bis hin zur Sterilisation. Pasteurisation erzielt als Form von Kurzzeiterhitzung eine Keimabtötung von 99,5 %. Verglichen dazu beseitigt zwei bis acht Sekunden Ultrahecherhitzung 99,9 – 100 % der Keime, während 20- bis 50-minütiges Sterilisationsverfahren 100 % Keimabtötung verspricht (Tab. 3) [Heiss et al., 2004].

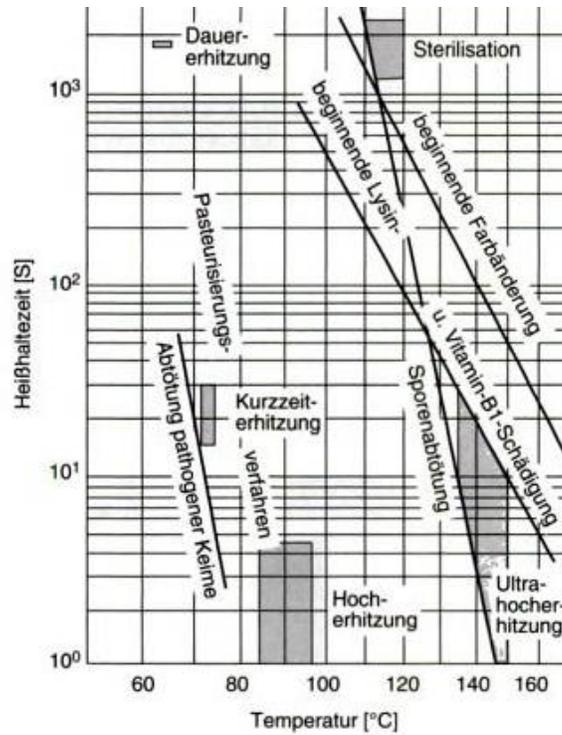


Abb. 2: Eingrenzung der Arbeitsfelder von Milcherhitzern [Heiss et al., 2004]

Tab. 3: Milcherhitzungsverfahren [Heiss et al., 2004]

| Verfahren | Temperatur [°C] | Zeit | Keimabtötung [%] | Bemerkungen |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|------------------|-------------------------------|
| Aufkochen | ~ 100 | - | - | Haushaltsmethode |
| Dauererhitzung | 62 – 65 | 30 – 32 min | 95 | unwirtschaftlich |
| Kurzzeiterhitzung („Pasteurisation“) | 72 – 75 | 15 – 30 s | 99,5 | kaum Vitaminverluste |
| Hoherhitzung | 85 – 127 | 8 – 15 s | 99,9 | bis zu 20 % Vitaminverluste |
| Ultrahocherhitzung | 135 – 150 | 2 – 8 s | 99,9 – 100 | nur bei aseptischer Abfüllung |
| Sterilisation | 110 – 115 | 20 – 50 min | 100 | ca. 30 % Vitaminverluste |

1.3 Konsequenzen der Erhitzung

Verschiedenste Milcherzeugnisse werden anhand solcher Verfahren gebildet und zu handelsüblichen Nahrungsmittelprodukten weiterverarbeitet. Bei Ausübung solcher Prozesse zeigen sich Konsequenzen für das Produkt und somit auch für den Verbraucher selbst.

1.3.1 Herabsetzung der ernährungsphysiologischen Qualität von Milchproteinen aufgrund „blockierten“ Lysins

Lysin zählt zu den essentiellen Aminosäuren und kann dadurch nicht selbst vom Körper synthetisiert werden. Es ist in verschiedensten Lebensmitteln enthalten, vor allem in proteinreichen Tierprodukten [Carpenter, 1960]. Besonders in erhitzten Lebensmitteln wie Backwaren, Cerealien, ebenso Milchprodukten und Säuglingsnahrung wurde erhebliche Lysinschädigung ermittelt [Erbersdobler et al., 1991]. Dies könnte aufgrund der durch Hitze entstehenden Glykierung von Proteinen in Milch zurückzuführen sein. Somit kann es zu einer reduzierten Verdaubarkeit [Finot et al., 1969], zu einer Enzyminhibierung sowie allgemein zu einer Polymerisation der Milchproteine [Henle et al., 1996] führen. Vor allem bei der Kinder- und Säuglingsnahrung wäre es ratsam, die vorgesehene Charge auf ihren Gehalt an „verfügbarem Lysin“ zu untersuchen [Baltes et al., 2011]. Die größten Anteile an „blockiertem“ Lysin sind im walzengetrockneten Milchpulver, in der Kondensmilch, sowie auch in der sterilisierten Milch zu finden, während sprühgetrocknetes Milchpulver, gezuckerte Kondensmilch und vor allem pasteurisierte Milch nahezu kein blockiertes Lysin aufweisen [Mauron et al., 1990].

1.3.2 Verlust von Vitaminen und Mineralstoffen

Zink, Kupfer, Magnesium und Calcium zählen zu wichtigen Spurenelementen, die als Enzymbestandteile sowie im Muskel- und Knochenaufbau sehr von Bedeutung sind. Während der Erhitzung können entstehende Maillard-Produkte jene Metallionen komplexieren [O'Brien et al., 1997], was zu Stoffwechselstörungen führen kann. Auch auf Vitamine können sich diese Produkte schädlich auswirken, vor allem auf die wasserlöslichen, wobei Vitamin C am

temperaturlabilsten ist. Pasteurisation und Ultrahoherhitzung (UHT) führen zu jeweils 10 % Verlust an Vitamin B₁, B₆, B₁₂ und Folsäure sowie 25 % Verlust an Vitamin C zur Folge, wohingegen die Sterilisation Verluste von bis zu 90 % an Vitamin C und B₁₂ nach sich ziehen kann. Bei Vitamin B₃ und Folsäure werden Verluste von bis zu 50 % aufgezeigt, während Vitamin B₁, auch genannt Thiamin, Verluste von bis zu 35 % im Laufe des Sterilisationsprozesses einbüßen kann. Die Lagerung in Tetra Paks soll die Milch vor Licht- und Sauerstoffzufuhr und somit weiteren Vitaminverlust schützen. In weiteren Untersuchungen von UHT Milch wurde festgestellt, dass der Verlust von vor allem Vitamin C und Folsäure beträchtlich von dem verbleibenden Sauerstoffgehalt in der Milch beeinflusst wird; wird die Milch unter Verdampfungskühlung behandelt, sodass nahezu kein Sauerstoffgehalt in der Packung verbleibt, sind die Vitaminverluste sehr gering. Beim indirektem UHT-Prozess ohne Verdampfungskühlung können bis zu 8 mg/kg gelöster Sauerstoff in der Packung verbleiben, wobei Vitamin C und Folsäure nach ein paar Tagen gänzlich verloren gehen [Rolls et al., 1973].

1.3.3 Entstehung antioxidativer und antibakterieller Komponenten

Antioxidative Wirkung bezieht sich auf eine Abschwächung von Oxidationsvorgängen. In diesem Fall wirkt β -Lactoglobulin als antioxidativer Wirkstoff; es kann die Haltbarkeit erhöhen und das ranzig-Werden der Milch verhindern, indem es die Oxidation der Lipide vermindert. Auf der einen Seite wird berichtet, dass jene Wirkung in erhitzter Milch stärker gezeigt wird als in nicht erhitzten Proben [Chevalier et al., 2001], wobei in einer anderen Studie der Verlust antioxidativer Wirkung bei erhitztem β -Lactoglobulin festgestellt wird [Liu et al., 2007]. Weiters wurde auch beobachtet, dass durch Maillard-Produkte bakterielles Wachstum verhindert werden kann [Einarsson et al., 1983].

1.3.4 Entstehung von Aromastoffen und brauner Färbung

Bei der Erhitzung von Milch entstehen flüchtige Verbindungen, die als Aromastoffe freigesetzt werden. Sie entstehen hauptsächlich aus niedermolekularen Spaltprodukten, die aus zersetzten

Amadori-Produkten hervorgehen [Danehy, 1986]. Der dabei entstehende, unangenehme „gekochte“ oder „abgestandene“ Geschmack in ultrahocherhitzter Milch kann mit der Bildung flüchtiger schwefelhaltiger Verbindungen, Methyl-Ketonen und aliphatischer Verbindungen in Zusammenhang gebracht werden, die während dem Erhitzungsprozess und anschließender Lagerung entstehen [Zabbia et al., 2012]. In der fortgeschrittenen- und späten Phase der Maillard-Reaktion entsteht aufgrund von Melanoidinen auch eine braune Färbung der Milch (Abb. 3) [Namiki, 1988].

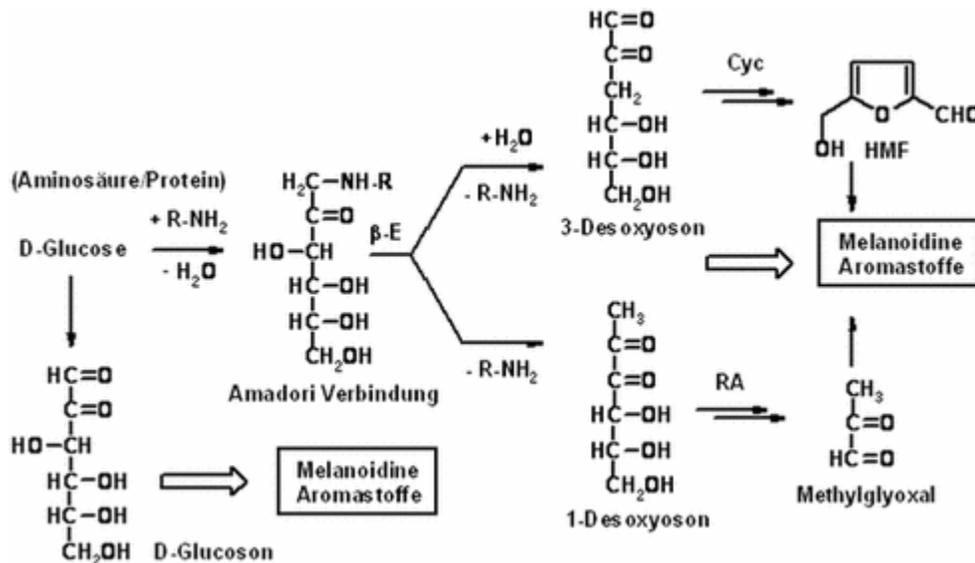


Abb. 3: Schematischer Reaktionsverlauf der Bildung von Aroma- und Farbstoffen (Melanoide). (β-E: β-Eliminierung, Cyc: Zyklisierung, RA: Retro-Aldol-Reaktion) [Abboud, 2008]

1.3.5 Krankheitserregende Effekte

Advanced Glycation Endproducts (AGEs) modifizieren die Expression und Funktion von Proteinen, unter anderem intra- und extrazelluläre Proteine einschließlich antioxidativer und metabolischer Enzyme, Lipoproteine, Membrankanäle und transkriptioneller sowie struktureller Proteine. Dies führt zu endothelialer Dysfunktion, Entzündung, oxidativem Stress und veränderter Lipoproteinfunktionen. Dies steht im Zusammenhang mit Komplikationen bezogen auf Krankheiten wie zum Beispiel Diabetes mellitus [Bierhaus et al., 1998], Nierenerkrankungen (Nephropathie) [Weiss et al., 2000], Nerven- und über Diabetes folgende Netzhauterkrankungen [Han et al., 2007].

1.4 Maillard-Reaktion

1.4.1 Prinzip

Die Maillard-Reaktion fand ihren Ursprung im Jahre 1912, als L. C. Maillard eine Reaktion beobachtete, die beim Erhitzen eines Gemisches von D-Glukose und L-Glycin entstand. Im Verlaufe dieser Reaktion zeigte sich ein brauner Niederschlag, welcher häufig bei Erhitzung von Lebensmitteln wie Braten von Fleisch, Backen von Brot oder auch Erhitzen von Milch vorkommen. Reduzierende Zucker und Aminosäuren sind Auslöser solcher Braunverfärbungen, einer nicht-enzymatischen Bräunung, basierend auf der Maillard-Reaktion. Auch für die Aroma- und Farbentwicklung ist es von Bedeutung, da beim Erhitzen gleichzeitig charakteristische Aromastoffe freigesetzt werden. Die daraus resultierenden Produkte, sogenannte Amadori-Produkte, kommen auch in einigen Lebensmitteln vor; zum Beispiel Fruktosyl-Aminosäuren. Fruktosyl-Prolin (V) in fermentiertem Tabak wird in der Glutzone der Zigarette abgebaut, während der Nachweis anderer Fruktose-Aminosäuren als Vorstufen von Fehl aromabildungen und somit als Leitsubstanzen beginnender Produktschädigung fungieren können [Baltes et al., 2011].

In der Maillard-Reaktion sind Abläufe verschiedenster kinetischer Reaktionen miteingeschlossen [Martins et al., 2001]. Sie kann in drei Stufen eingeteilt werden: der frühen-, fortgeschrittenen- und schließlich späten Phase. In der frühen Phase der Maillard-Reaktion in Milch entsteht durch Reaktion von Laktose als offenkettiger Aldehyd mit proteingebundenem Lysin die Bildung einer instabilen Schiff'schen Base. Sogenannte Amadori-Umlagerungen sorgen für die Umlagerung des Aldehyd-Zuckers in einen Keto-Zucker, woraus sich Lactulosyllysin ergibt (Abb.4) [Birlouez-Aragon et al., 2004]. Im Falle der Milcherhitzung ist dies das entstehende Amadori-Produkt, welches sich durch Verhindern drastischer Temperatureinflüsse relativ stabil zeigen lässt. In dieser Phase liegt der Schwerpunkt in der Verfügbarkeit von Lysin für die Bildung von Amadori-Produkten; Farb- oder Aromastoffe entstehen in diesem Prozess noch nicht [Boekel et al., 1988].

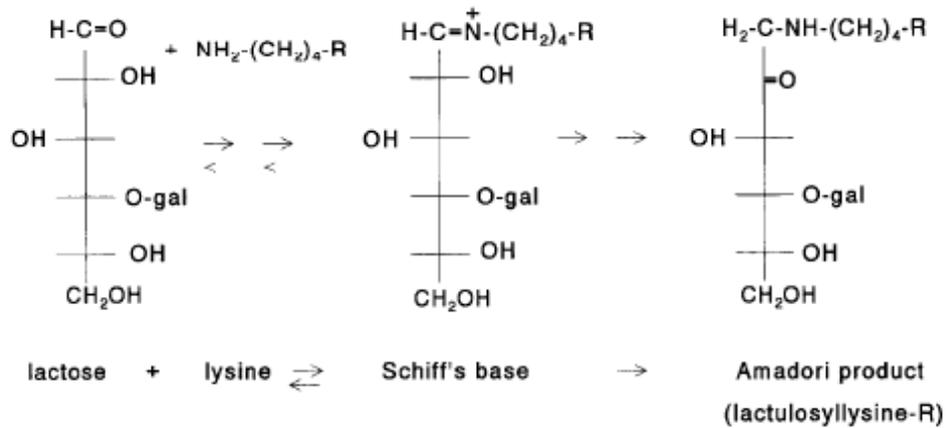


Abb. 4: Schematischer Überblick der frühen Phase der Maillard-Reaktion, bis hin zum Amadori-Produkt (gal: Galaktose, R: Rest der Proteinkette) [Boekel et al., 1988]

Weiters werden durch den Abbau des Amadori-Produktes weitere Produkte erhalten, wie Furosin, Pyridosin und Lysin mittels Säurehydrolyse [Finot et al., 1969], Hydroxymethylfural (HMF) durch Auskochen in Oxal- oder Essigsäure und schließlich Carboxymethyllysine über oxidative Spaltung (Abb. 5) [Ahmed et al., 1986]. In der fortgeschrittenen Phase werden weiterhin unter sauren, alkalischen oder neutralen Bedingungen neue Produkte geformt. Diese Produkte werden alle unter dem Begriff „Advanced Glycosylation Endproducts (AGE)“ zusammengefasst. Sie können danach weiter kondensieren oder zu Vernetzungen führen [Baltes et al., 2011]. Reaktive Komponenten der fortgeschrittenen Phase führen in der späten Phase zur Bildung der braunen Pigmente, den Melanoidinen. Auch Proteinquervernetzungen finden in dieser Phase statt [Boekel et al., 1988].

AGEs werden für ihre gelb-bräunliche, fluoreszierende Farbe und deren Fähigkeit, Proteine miteinander verlinken zu können, charakterisiert [Bierhaus et al., 1998].

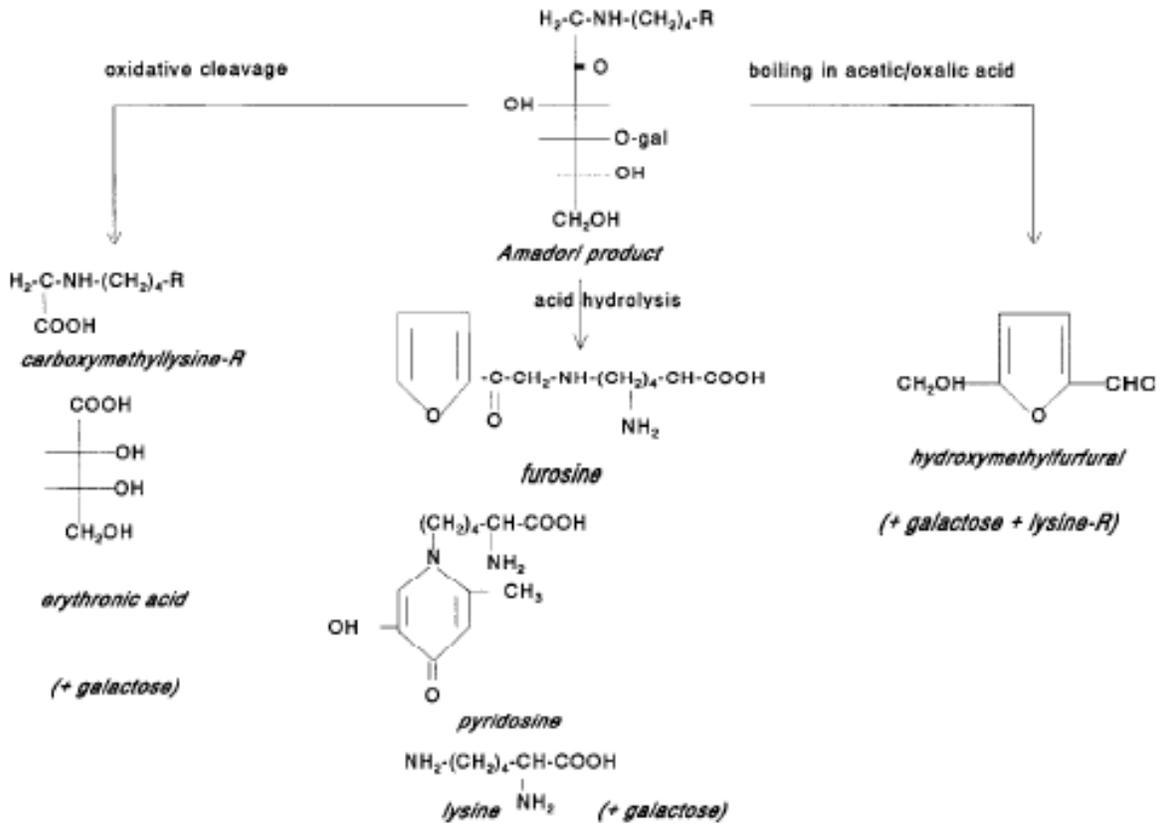


Abb. 5: Zersetzung des Amadori-Produkts über oxidative Spaltung, Säurehydrolyse und Auskochen in Oxal-/Essigsäure (gal: Galaktose, R: Rest der Proteinkette) [Boekel et al.,1988]

1.4.2 N^ε-Carboxymethyllysine

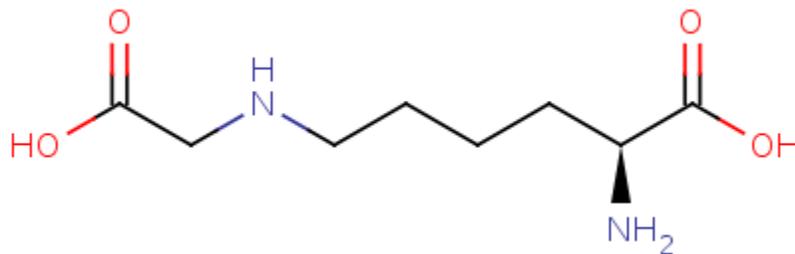


Abb. 6: Strukturformel von N^ε-Carboxymethyllysine [Thornton et al., 2014]

1.4.2.1 Synthesewege von N^ε-Carboxymethyllysin

N^ε-Carboxymethyllysin (CML) zählt zu den Vertretern der „Advanced Glycosylation Endproducts“. Es gilt als guter Marker für stärkere Hitzeeinwirkung und somit als Indikator für degradiertes Lysin in Milch, die auf unterschiedlichste Weise behandelt wird [Hewedy et al., 1994]; auch Furosin wird gerne als solch ein Indikator herangezogen [Erbersdobler & Hupe, 1991; Evangelisti et al., 1994]. CML ist wie bereits erwähnt ein fortgeschrittenes Maillard-Produkt und kann über verschiedenste Wege gebildet werden.

Der erste Weg ist direkt über die Glukose, die zu Glyoxal, ein Zwei-Kohlenstoff-Zwischenprodukt der Maillard-Reaktion und ebenso wichtige Vorstufe zur Bildung von CML [Hayashi & Namiki, 1980], oxidiert werden kann (Abb.7) [Well-Knecht et al., 1995]. In weiterer Verbindung einer Lysinkette entsteht daraus CML. Eine weitere Option ist die Oxidation der Schiff'schen Base, der Vorstufe zum Amadori-Produkt, die über eine Retro-Aldol-Kondensation wieder zur Bildung von Glyoxal und weiters zu CML führt [Glomb et al., 1995].

Bei der oxidativen Spaltung zwischen dem C2 und C3 des Amadori-Produktes entsteht CML und Erythronsäure [Ahmed et al., 1986]. Diese Form der Spaltung lässt sich aus einem radikalischen Mechanismus entstehenden Hydroxylradikal zurückführen, wobei CML aus dem Amadori-Produkt synthetisiert wird [Nagai et al., 1997]. Als reaktive Stickstoffspezies kann Peroxynitrit (ONOO⁻) ebenfalls zur Bildung von CML über die Oxidation des Amadori-Produktes leiten [Nagai et al., 2002]. Weiters führt auch ein Myeloperoxidase-H₂O₂-Chlorid System zur Bildung von CML, in dem das Enzym Myeloperoxidase Hypochlorsäure (HOCl) aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Chlor entstehen lässt, welches weiters mit freien α-Aminosäuren zu Aldehyden, hier Glycolaldehyden, reagiert [Anderson et al., 1999]. Auch in Vorgängen der Lipidperoxidation und –oxidation wurden Synthesen von CML beobachtet [Fu et al., 1996; Fenaille et al., 2006], sowie auch allgemein der Syntheseverlauf speziell in alkalischem Milieu [Nagai et al., 1988].

Als Produkt nicht-enzymatischer Glykierungs- und Oxidationsreaktionen gilt CML allgemein als Marker von Glykoxidationsreaktionen. Es sind auch weitere Versuche bekannt, CML aus anderen Fusionsprodukten mittels Maillard-Reaktion zu gewinnen, wie zum Beispiel aus Glukose und Collagen [Ferreira et al., 2003]. Weiters wird in der Reaktion von Ascorbinsäure und Lysin unter autooxidativen Bedingungen die Bildung von N^ε-Carboxymethyllysin festgestellt [Dunn et al., 1990]. Das ist in dem Sinne von Bedeutung, da Ascorbinsäure in Form von Ascorbyl-palmitat in verschiedenen Lebensmitteln zugesetzt wird [Spanyar et al., 1963].

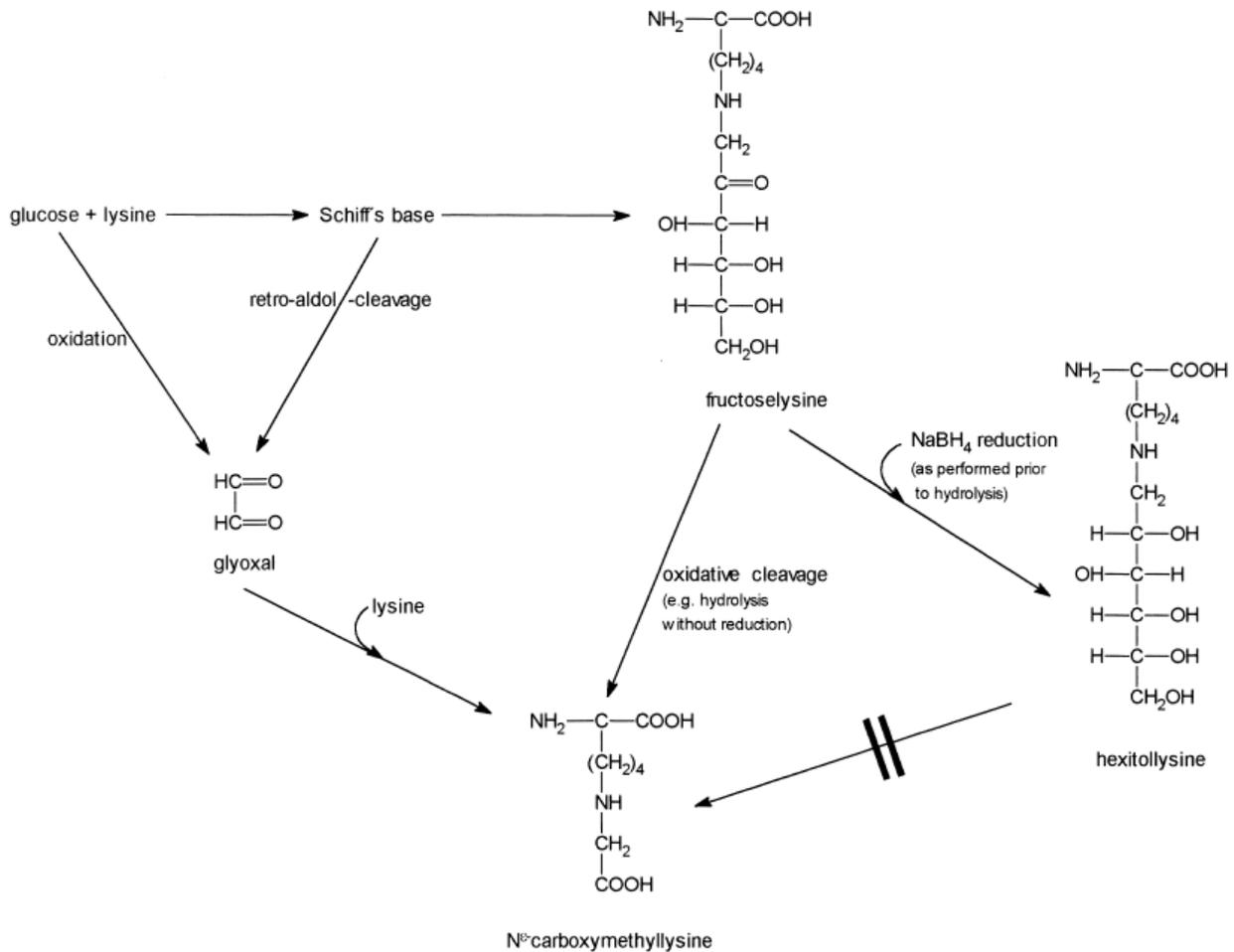


Abb. 7: Mögliche Bildungswege von N^ε-Carboxymethyllysin [Drusch et al., 1999]

1.4.2.2 N^ε-Carboxymethyllysin in Milcherzeugnissen

Um den Gehalt an CML in Milch bestimmen zu können, wird eine Säurehydrolyse durchgeführt, anschließend die Proben derivatisiert und mittels RP-HPLC analysiert [Drusch et al., 1999; Faist et al., 2000]. Während der Säurehydrolyse kann weilers CML durch oxidative Spaltung entstehen, wobei es ausschlaggebend ist, vor der Hydrolyse eine Reduktion mit Natriumborhydrid durchzuführen [Dunn et al., 1990; Hartkopf et al., 1994], was in Abb. 7 zusätzlich dargestellt wird. Das hierbei entstehende Hexitollysine kann somit keine weitere Spaltung eingehen, womit in diesem Verfahren das rein in dem Produkt enthaltene N^ε-Carboxymethyllysin bestimmt werden kann. Es ist anzumerken, dass, wie bereits erläutert, N^ε-

Carboxymethyllysine nicht ausschließlich ein Produkt der Maillard-Reaktion, sondern nur unter anderem ein mögliches Endprodukt daraus ist, ist die erfasste Menge CML nicht proportional zur Konzentration des Amadori-Produkts. Weitere verwendete Techniken im Falle von CML-Analyse sind unter anderem auch Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC/MS) sowie auch Immunassay-Verfahren (ELISA) [Charissou et al., 2007].

Der Gehalt an CML in Milcherzeugnissen kann von Produkt zu Produkt variieren (Tab. 4). Ein wichtiger und ausschlaggebender Faktor hierfür ist die Zubereitung und Erhitzungsverfahren des Milchproduktes. Hierbei ist bekannt, dass die Menge an synthetisiertem CML mit der Höhe der Hitzeeinwirkung zunimmt [Hewedy et al., 1994].

Tab. 4: Überblick an CML-Gehalt in verschiedenen Milchprodukten [Henle, 2013]

| Produkt | CML [mg/100 g Protein] |
|-------------------------------|-------------------------------|
| Rohmilch | 0,1 – 0,2 |
| pasteurisierte Milch | 0,1 – 8,0 |
| Kondensmilch | 20,5 – 101,5 |
| Ultrahocherhitzte Milch (UHT) | 0,9 – 8,3 |
| aromatisierte Milch | bis zu 41,3 |
| laktosefreie Milch | bis zu 6,7 |
| Milchpulver | bis zu 23,1 |

1.4.2.3 N^ε-Carboxymethyllysine als Marker im menschlichen Körper

Im Gegensatz zu den übrigen „Advanced Glycation Endproducts“ zeigt CML weder eine Farbe oder Fluoreszenz, noch besitzt es die Fähigkeit Proteine zu verlinken [Bierhaus et al., 1998]. Es stellt einen Marker für oxidativen Stress und Langzeitschädigung von Proteinen im Alterungsprozess, bei Arteriosklerose und Diabetes dar. Immunlokalisation zeigte eine Akkumulation von CML im Körper in Haut, Lunge, Niere, Herz, Darm, Bandscheiben und erstrangig in den Arterien. Hier wurde es erhöht in den Wänden und elastischen Membranen der Arterien lokalisiert. Schwere Veränderungen von CML wurden in Arteriosklerose in Form von Plaques sowie in Schaumzellen beobachtet [Schleicher et al., 1997].

Neben dem Gewebe wird CML auch im Urin nachgewiesen [Bierhaus et al., 1998], wobei es im urämischen Serum zu mehr als 95 % an Protein gebunden vorliegt [Weiss et al., 2000]. Die unzureichende Ausscheidung von CML durch die Niere als auch der durch Neubildung aufkommende oxidative Stress sind der Grund für eine erhöhte CML-Konzentration im Serum von Patienten chronischer Niereninsuffizienz. Solch eine erhöhte Konzentration sollte jedoch kein höheres Risiko an Mortalität hervorrufen [Schwedler et al., 2002; Busch et al., 2004].

An der Zelloberfläche ist unter anderem ein Rezeptor, genannt RAGE („Receptor of Advanced Glycation Endproducts“), lokalisiert, der mittels seiner multiplen Bindungsstellen Produkte aus der Maillard-Reaktion wie zum Beispiel N^ε-Carboxymethyllysin binden kann [Tanji et al., 2000; Kislinger et al., 1999]. Dies geht jedoch mit Krankheiten wie Diabetes mellitus [Basta et al., 2004; Singh et al., 2001] und auch Alzheimer [Münch et al., 1997] einher, da eine solche Bindung Signalkaskaden aktiviert und somit proinflammatorische Wirkungen mit sich zieht, wie beispielsweise eine Regulation der Transkription proinflammatorischer Gene [Kislinger et al., 1999].

Die Elimination von CML wird in den Nieren vollzogen [van de Kerkhof et al., 2004].

1.5 Zielsetzung

N^ε-Carboxymethyllysin gilt als Vertreter der fortgeschrittenen bzw. späten Phase der Maillard-Reaktion; eine Folge von Reaktionsabläufen, welche bei der Herstellung sowie Lagerung von Lebensmitteln stattfinden. Wie zuvor erwähnt, findet es auch als Marker im menschlichen Körper verbunden mit Krankheitserscheinungen Zusammenhang. Akkumulationen in verschiedenen Geweben können erhebliche Folgen bis hin zur Arteriosklerose führen. Ziel dieser Arbeit war es, dessen Gehalt in proteinreichen Lebensmitteln zu untersuchen und quantitativ bestimmen zu können.

Als guter Marker für stärkere Hitzeeinwirkung spielt N^ε-Carboxymethyllysin in Milch als Indikator für degradiertes Lysin eine erhebliche Rolle. Für diese Arbeit wurden handelsübliche Milch und Milcherzeugnisse als Probanden herangezogen. Es wurde bei der Auswahl auf unterschiedliche Hitzebehandlung und unterschiedliche Herstellungsprozesse des Produktes geachtet. Dementsprechend wird N^ε-Carboxymethyllysin auch als Indikator für Hitzeschädigungen in Lebensmittel angesehen.

Das Hauptaugenmerk wurde vorerst darauf gelegt, eine geeignete und vor allem reproduzierbare Methode zu finden, N^ε-Carboxymethyllysin weitgehend schonend und vollständig aus den Produkten isolieren zu können. Anhand einiger durchgeführter Studien als Vorlage wurde versucht, eine optimale Methode zur Erfassung des Amins zu generieren, um nachvollziehbare Mengenkonzentrationen an CML in den Milcherzeugnissen unter Berücksichtigung der jeweiligen Behandlungsart sowie verglichen zueinander zu erhalten.

2. Materialien und Methoden

2.1 Analysevorbereitungen

2.1.1 Ausgewählte Proben

Als Proben wurden handelsübliche Milcherzeugnisse ausgewählt, welche unterschiedlichen Hitzebehandlungen ausgesetzt wurden. Auf die Wahl der Herstellfirma wurde dabei keine Rücksicht genommen, jedoch auf die Behandlungsart.

Folgende Tabelle zeigt eine Übersicht aller Probanden, inklusive produktspezifische Behandlungsart, Artikelnummer, Hersteller und Abbildung des Produktes.

Tab. 5: Zusammenfassung der behandelten Proben. Behandlungsart wurde dem jeweiligen Hersteller entnommen

| Proben inkl. Behandlungsart | Artikelnummer | Hersteller | Abbildung |
|--|---------------|------------|---|
| Vollmilch 3,5% Fett pasteurisiert, mikrofiltriert, länger frisch | 404201 | Stainzer |  |

Haltbare Vollmilch

L2

S-BUDGET

ultrahocherhitzt, 3,5% Fett



Kaffeemilch

kondensierte Vollmilch,
ungezuckert, 7,5% Fett,
17,5% fettfreie
Milchtrockenmasse,
sterilisiert

2149

SPAR



Buttermilch laktosefrei

hergestellt aus
pasteurisierter Milch,
< 0,01 g Laktose /100 ml

L140031-061-A-
01977

SPAR free
from



Kakaomilch

mit Vollmilch,
ultrahoherhitzt
(Vollmilch (93%),
Zucker, fettarmer Kakao
(1,5%), Traubenzucker,
Verdickungsmittel:
Carrageen, Vanille-
Aroma)

L4013

Siggi



Die Vollmilch von Stainzer wurde pasteurisiert sowie mikrofiltriert, während die Haltbarmilch von S-BUDGET ultrahoherhitzt wurde. Die Kaffeemilch von Spar entspricht der Behandlung einer Kondensmilch, 17,5 % fettfreier Milchtrockenmasse und wurde zusätzlich auch sterilisiert. Die laktosefreie Buttermilch wurde aus pasteurisierter Milch hergestellt und enthält weniger als 0,01 g Laktose pro 100 ml Milch. Siggi's Kakaomilch, hergestellt aus Vollmilch, wurde ultrahoherhitzt und enthält auch andere Zusatzstoffe wie Zucker, fettarmer Kakao, Traubenzucker und Verdickungsmittel, unter anderem Vanille-Aroma. Ebenso kann es laut Hersteller Spuren von Soja enthalten.

2.1.2 Verwendete Materialien

In den folgenden Tabellen wurden sämtliche Reagenzien und Geräte aufgelistet, die im Laufe der Arbeit Gebrauch fanden.

Tab. 6: Überblick verwendeter Reagenzien für die Probenaufbereitung inklusive Standard

| Reagenzien | Lot | Hersteller |
|-----------------------------|---------------|----------------|
| Natriumborhydrid | 40250 | Riedel-de-Haën |
| Borat-Pufferlösung (pH 9,2) | 33445060 | Merck |
| Trichloressigsäure | 152178672 | Roth |
| Salzsäure rauchend 37% | K22486317 546 | Merck |

| | | |
|---------------------------------------|-----------|---------------------------------|
| Dansylchlorid | BCBJ2074V | Sigma |
| Natriumcarbonat | 9746536 | Merck |
| N ^ε -Carboxymethyl-L-lysin | SC1505 | PolyPeptide Laboratories France |
| Wasser | - | Millipore, Simplicity |

Tab. 7: Überblick verwendeter Reagenzien für die Laufmittelherstellung

| Reagenzien | Lot | Hersteller |
|------------------------|------------|-------------------------|
| Natriumacetat-3-hydrat | 0506201014 | J. T. Baker |
| N,N-Dimethylformamid | 183199488 | Roth |
| Triethylamin | B33468 | Calbiochem [®] |
| Methanol Optigrade | 124 640 | Promochem [®] |

Tab. 8: Überblick der im Laufe des Projektes verwendeten Geräte

| Verwendete Geräte | Hersteller |
|--------------------------|---------------------------------|
| Heizblock | Heidolph MR Hei-Standard |
| Trockenschrank | Heraeus Thermo Scientific |
| Waage | Mettler Toledo AG135 & AG245 |
| Vortex | IKA [®] MS1 Minishaker |
| Zentrifuge | Eppendorf, Centrifuge 5804 R |
| HPLC Anlage | Hewlett Packard Series 1100 |

2.1.3 Aufbereitung der Proben

Je Milcherzeugnis wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, für jede einzelne Probe galten die exakt gleichen Bedingungen. Die Durchführung geht größtenteils auf *Fenaille et al. (2006)* zurück. Folgende Abbildung zeigt eine Übersicht der Probenaufbereitung. Anschließend wird auf jeden Schritt näher eingegangen.

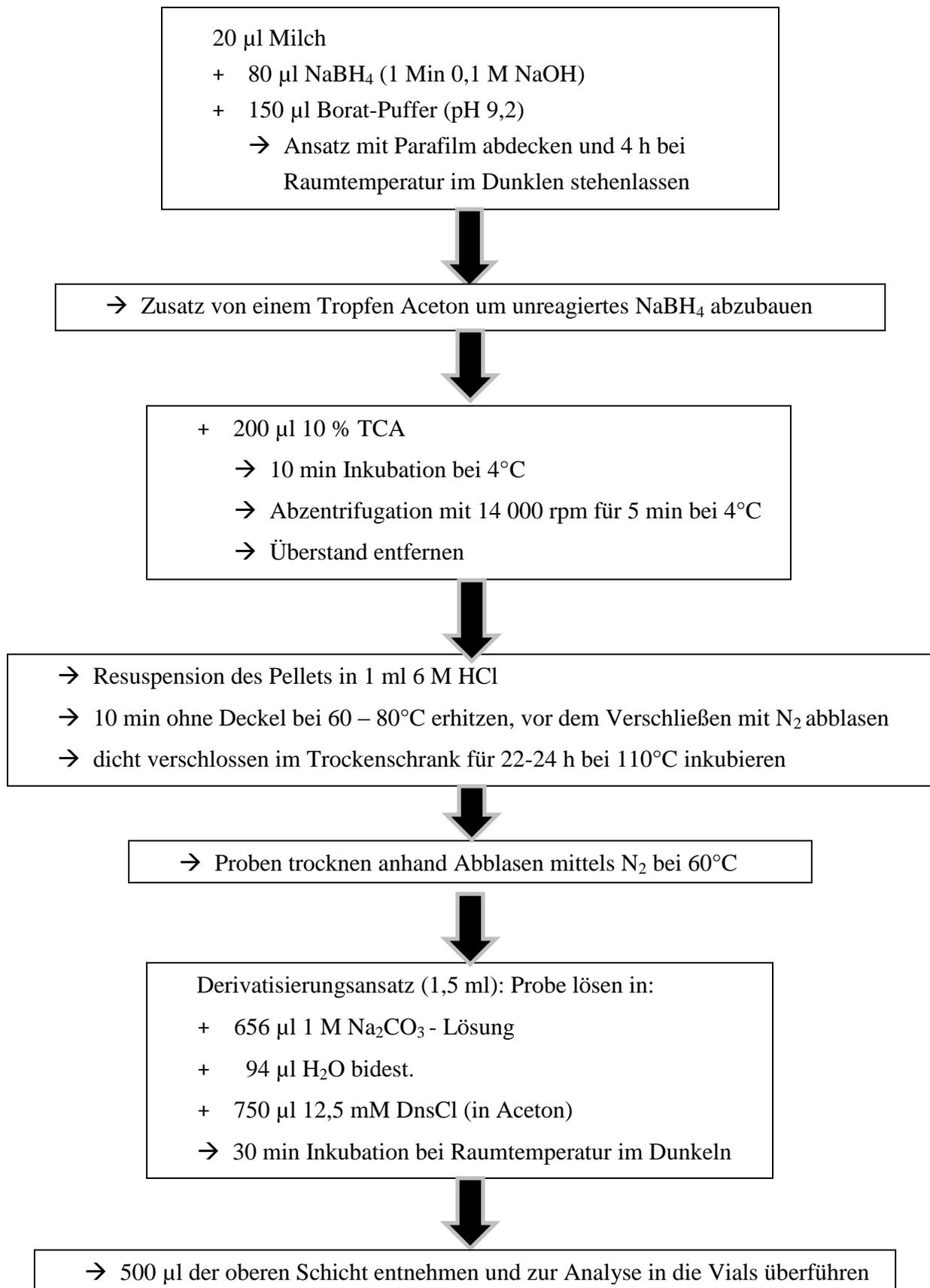


Abb. 8: Schema der Probenaufbereitung

2.1.3.1 Reduktion

Für den Reduktionsvorgang wurde jeweils ein 20 µl-Aliquot der Proben entnommen und mit 150 µl Borat-Puffer (pH 9,2) und 80 µl Natriumborhydrid (1 M in 0,1 M NaOH) vermischt. Da, wie bereits in Kapitel 1.4.2.2 erwähnt, während der Hydrolyse aufkommende oxidative Spaltung zur spontanen Bildung weiteren CMLs führen kann, muss dies zuvor anhand Reduktion mittels Natriumborhydrid durch Bildung von Hexitolysin verhindert werden [Dunn et al., 1990]. Im Gegensatz zum Amadori-Produkt kann Hexitolysin in seiner Form nicht weiter zu CML abgebaut werden; somit kann ausschließlich das ursprünglich enthaltene CML in der Probe erfasst werden. Dieser Reduktionsvorgang benötigt eine Dauer von vier Stunden. Die Effektivität dieses Vorganges wurde anhand Abwesenheit von Furosin, welches während der Säurehydrolyse von Milchprodukten entsteht, im Hydrolysat der reduzierten Proben überprüft [Resmini et al., 1990]. Dabei werden die Ansätze mittels Parafilm abgedeckt und bei Raumtemperatur im Dunklen vier Stunden stengelassen [Fenaille et al., 2006].

Um das unverbrauchte Natriumborhydrid abzunehmen, werden nach der Inkubationszeit jeweils ein Tropfen Aceton den Ansätzen hinzugefügt.

2.1.3.2 Präzipitation

Anschließend wird eine Präzipitation mittels 10 %-iger Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt, um die Milchproteine isolieren zu können. Dazu wurden 200 µl TCA je Ansatz hinzupipettiert, vermischt und 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden sie mit 14 000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und schließlich der Überstand entfernt (Abb. 9) [Sanches et al., 2004].



Abb. 9: Präzipitierte Ansätze nach Zentrifugation

2.1.3.3 Hydrolyse

Darauf folgt die Säurehydrolyse. Dabei wurde jedes Proteinpellet in 1 ml 6 M Salzsäure (HCl) gelöst. Anschließend wurden die Proben vor Verschluss ohne Deckel auf dem Heizblock für ca. 10 min bei 60 – 80 °C erhitzt, um während des Hydrolysevorganges das Ansammeln von Probenmaterial auf dem Deckel zu verhindern. Danach werden sie kurz mit Stickstoff abgeblasen, um die in den Vials enthaltene Luft mit Stickstoff zu ersetzen, luftdicht verschlossen und bei 110 °C für 22 – 24 h im Trockenschrank inkubiert. Das Ersetzen der Luft mittels Stickstoff soll oxidativen Prozessen während des Hydrolysevorganges entgegenwirken.



Abb. 10: Probanden vor (links) und nach vollzogener Hydrolyse (rechts)

Willkürlich zeigen sich nach der Hydrolyse teils farblose, teils gelblich verfärbte Probelösungen (Abb. 10). Worauf diese Verfärbungen beruhen schien unklar, da jede Probe exakt gleich behandelt wurde. Die Proben wurden mit Stickstoff getrocknet. Um den Prozess zu beschleunigen wurde dies auf dem Thermoblock unter Einwirkung von Wärme bei 60 °C durchgeführt.

2.1.3.4 Derivatisierung

Um CML mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) über einen Fluoreszenzdetektor detektierbar machen zu können, müssen die Proben vorerst einer Derivatisierung unterzogen werden. Dadurch wird eine Störung der Amin-Matrix verhindert und

eine erhöhte Detektionssensibilität erreicht [Anli et al., 2004]. Hauptsächlich werden hierfür *ortho*-Phthalaldehyd (OPA) [Drusch et al., 1999; Beljaars et al., 1998; Frattini et al., 1998] oder Dansylchlorid [Faist et al., 2000; Molins-Legua et al., 1988] verwendet. OPA wird sehr erfolgreich als Derivatisierungskomponente eingesetzt, da es innerhalb weniger Minuten schon an primäre Amine bindet und ein starkes Fluoreszenz-Derivat bildet, jedoch sind diese nicht sehr stabil und müssen auch strikten Bedingungen unterliegen [Mafra et al., 1999]. Weiters ist Dansylchlorid die kostengünstigere Variante von beiden.

Zusätzlich wird auch zwischen zwei unterschiedlichen Methoden der Derivatisierung unterschieden, der Vor- und Nachsäulenderivatisierung. Im Falle von Aminen und Aminosäuren wird hauptsächlich „Pre-column-derivatization“ verwendet, also Derivatisierung vor der Auftrennung, bei der bereits derivatisierte Substanzen chromatographisch getrennt werden.

Für diese Arbeit wurde Dansylchlorid als Derivatisierungsreagenz verwendet. Es zählt zu einer der ältesten Arbeitstechnik in diesem Bereich und wird ausschließlich zur Vorsäulenderivatisierung verwendet. Gebrauch findet es zu Analysezwecken in Zusammenhang mit basischen Aminosäuren [Douša, 2004]. Es reagiert in Verbindung mit primären sowie sekundären Aminen zu den entsprechenden Dansyl-Derivaten. Dabei kommt es durch Abspaltung von HCl (Salzsäure) zur Bildung eines Sulfonamids. In folgender Abbildung wird das Reaktionsschema der Derivatisierung einesamins über Dansylchlorid zur einer stabilen, fluoreszierenden Verbindung gezeigt.

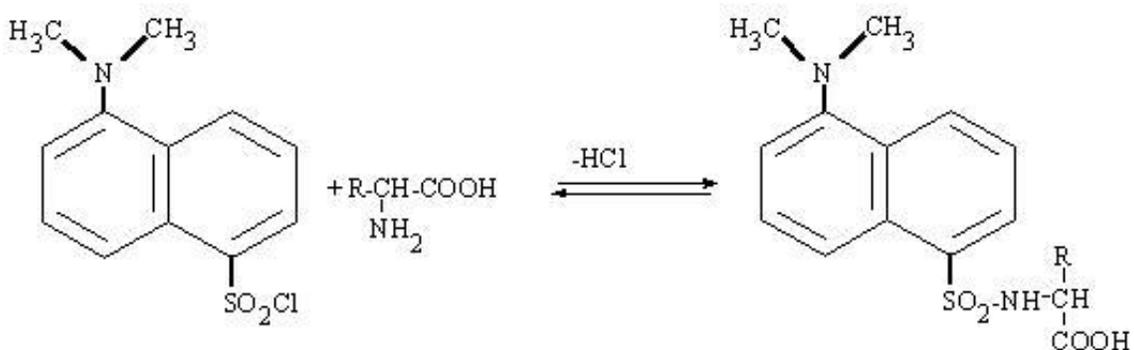


Abb. 11: Schema des Reaktionsablaufes von Dansylchlorid in Verbindung eines primären Amins [Douša, 2004]

Für diese Arbeit wurde in Aceton gelöstes Dansylchlorid mit einer Konzentration von 12,5 mM verwendet. Die Proben wurden vorerst im Verhältnis 1:8 in 1 M Natriumcarbonat gelöst und anschließend mit Dansylchlorid versetzt; das gesamte Volumen des Ansatzes betrug 1,5 ml (Tab. 9).

Tab. 9: Derivatisierungsansatz aller Proben

| Substanz | Menge [ml] |
|----------------------|-------------------|
| Natriumcarbonat | 0,656 |
| Wasser | 0,094 |
| Dansylchlorid | 0,750 |
| Gesamtvolumen | 1,5 |

Untersuchungen zeigten, dass für einen erfolgreichen Derivatisierungsablauf mit Dansylchlorid die Reaktion im alkalischen Milieu vollzogen werden muss [Moret et al., 1994; Wood-Rethwill & Warthesen, 1980]. Darum wurde aufgrund dessen nach einigen Versuchsdurchläufen die Probe in Natriumcarbonat gelöst, um einen pH-Wert von ca. 8 zu erzielen. Auch die Dauer der Derivatisierung wurde anhand einer Versuchsreihe optimiert, wobei sich eine Dauer von 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunklen am effizientesten erwiesen hat.

Nach Zugabe aller Komponenten bildete sich eine Phasentrennung (Abb. 12). Hierbei entstand eine gelbe, klare Schicht, worin sich die Derivatisierungsprodukte (Aminosäuren und Dansylchlorid) befanden, worunter sich eine farblose Schicht, zu einem sichtlich geringeren Anteil, absetzte. Hierin hielten sich auch die unlöslichen Partikel der Probe auf. Dabei fiel auf, dass jene Proben, die sich nach der Hydrolyse gelb verfärbten, einen größeren Anteil an unlösliche Partikel enthielten als jene farblosen Proben. In Abb. 12 entspricht der verfärbten Probe jene auf der rechten Seite. Es ist erkennbar, dass die eigentlich farblose, untere Schicht sichtlich trüber erscheint verglichen zu den beiden anderen Ansätzen. Für die weitere Analyse wurde nach der Inkubationszeit nur die obere Schicht zur Hand gezogen, der Rest wurde verworfen.

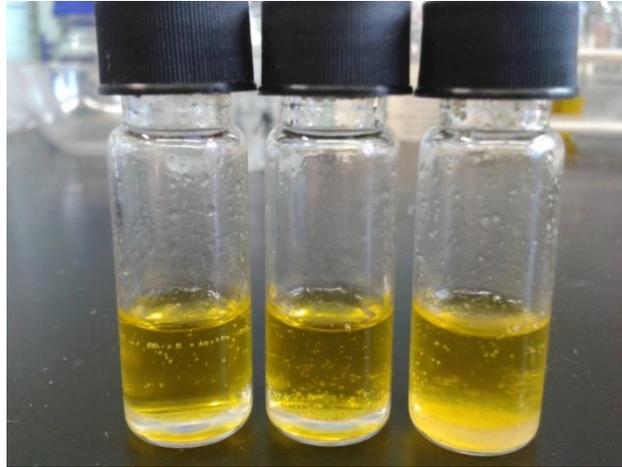


Abb. 12: Nach der Hydrolyse abgeblasene Proben, gelöst in den Komponenten des Derivatisierungsansatzes

2.2 Analyse mittels RP-HPLC

2.2.1 Prinzip

Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) zählt zu den gängigsten Methoden im Bereich der Analyse von Aminosäurederivaten und Aminen [Moravčík, 2014; Moret & Conte, 1996; Péter et al., 2000]. Für die Detektion werden hierfür hauptsächlich Fluoreszenz- [Liu et al., 2013; Birlouez-Aragon et al., 1998] oder UV-Detektoren [Romero et al., 2000; Allenmark et al., 1983] verwendet und gegebenenfalls zusätzlich mit massenspektrometrischen Einrichtungen gekoppelt [Fenaille et al., 2006; Ilisz et al., 2012].

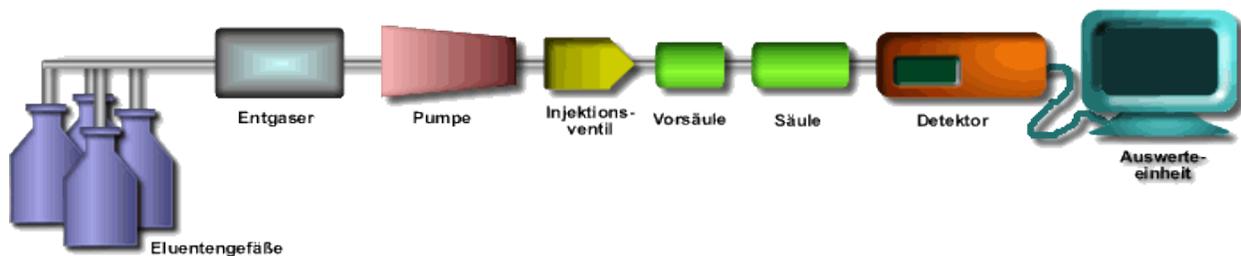


Abb. 13: Allgemeiner Geräteaufbau einer HPLC-Anlage [Salzer et al., 2013]

In dieser Form der analytischen Trennmethode ist die stationäre Phase üblicherweise fest und die mobile Phase (Eluent) flüssig, wobei der Trenneffekt auf die unterschiedliche Polarität beider Phasen zueinander beruht. Voraussetzung ist die Löslichkeit des Analyten im Laufmittel.

Hier wurde der Analysevorgang aller Probanden dieser Arbeit anhand Reversed-Phase-HPLC durchgeführt, auch genannt Umkehrphasenchromatographie. Dies entspricht das Vorhandensein einer unpolaren stationären Phase und einem polaren Laufmittel, wie beispielsweise Wasser, Methanol oder Acetonitril. Verglichen dazu werden bei Normalphasenchromatographie eine polare stationäre und unpolare mobile Phase wie Hexan, Heptan oder Essigester verwendet.

Bei Normalphasenchromatographie ist der physikalische Prozess der Adsorption der Trennmechanismus, hier können für stärker polare Analyten auch polare Eluentenzusätze beigefügt werden. Der Trennmechanismus bei Verwendung von RP-HPLC beruht auf dem Prinzip der Verteilung.

Die Lösungsmittel werden bei der Umkehrphasenchromatographie in Mischungen verwendet, wobei die Elutionskraft mit dem Verhältnis an organischem Lösungsmittel zu Wasser steigt. Da hier die stationäre Phase apolar bzw. hydrophob vorliegt, werden die Moleküle in umgekehrter Reihenfolge der Elutionsreihe nach ihrer Polarität getrennt; die polarsten Moleküle eluieren somit zuerst. Somit lassen sich über RP-HPLC vorwiegend polare Substanzen trennen [Salzer et al., 2013].

Die stationäre Phase der verwendeten Säule LiChrospher® besteht hierbei aus Kieselgel (SiO_2). Bei dieser Reversed-Phase – Ausgabe einer Kieselgelsäule ist jene mit C18-Ketten modifiziert und somit unpolar [Salzer et al., 2013].

Als Detektor wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet. Er kann bis zu 1000-mal sensitiver als ein UV/VIS Detektor sein, aufgrund des Messprinzips der Emissionsmessung. Anstatt der Differenz zweier Intensitäten wird hierbei emittierte Strahlung gemessen, die bei UV-Strahlung einer bestimmten Wellenlänge von Verbindungen absorbiert und als längerwelliges Licht emittieren. Somit wird das Molekül von einem Grund- in einen angeregten Zustand gebracht. Die Vorteile eines FLD liegen in einer hohen, selektiven Detektion, gut geeignet zur Gradientenelution und die Substanzen werden dabei nicht zerstört [Salzer et al., 2013].

2.2.2 Zusammensetzung des Laufmittels

Das Laufmittel A für die Elution des Analyten bestand aus 40 mM Natriumacetat, 10 % (v/v) Dimethylformamid (DMF) und 0,23 % (v/v) Triethylamin (TEA) [Romero et al., 2000]. Nach Zugabe aller Komponenten wurde der pH mittels Essigsäure auf den Wert 5 eingestellt. Laufmittel B bestand aus 100 % reines Methanol. Die Trennung erfolgte mittels Gradiententrennung, wobei zu Beginn 95 % Laufmittel A und 5 % Laufmittel B vorlagen; bis zum Ende der insgesamt 20 min Laufzeit war das Verhältnis auf 0 % Laufmittel A und 100 % Laufmittel B eingestellt (Tab. 11). Nach jedem Lauf erfolgten zusätzlich 4 min Post run. Zur Aufnahme der Chromatogramme wurde ein Fluoreszenzdetektor verwendet.

2.2.3 Untersuchungsparameter

Folgende Tabelle gibt Auskunft über die Geräteparameter sowie die jeweiligen Parametereinstellungen. Diese Einstellungen wurden für jede Messung beibehalten.

Tab. 10: Parameter der HPLC; für alle Messungen verwendet

| | |
|-------------------|---|
| Gerätesystem | RP-HPLC, Agilent Series 1100 |
| Säule | LiChrospher® 100 RP-18e, 5 µm |
| Injektionsvolumen | 10 µl |
| Fluss | 1 ml/min |
| Druck | 120 - 150 bar |
| Temperatur | 30 °C |
| Messlänge | 20 min + 4 min Post run |
| Detektion | Fluoreszenzdetektor (FLD) λ_{Ex} : 385 nm, λ_{Em} : 503 nm PMT-Gain: 0 – 8,5 min: 6 8,5 – 20 min: 14 |

Tab. 11: Gradient und Zusammensetzung der eingesetzten Laufmittel bei der Analyse über RP-HPLC

| Zeit | Laufmittel A | Laufmittel B |
|-------------|---|---------------------|
| | 40 mM Natriumacetat 100 ml Dimethylformamid (DMF) 2,3 ml Triethylamin (TEA) mit Essigsäure auf pH 5 einstellen | Methanol 100 % |
| 0 | 95 % | 5 % |
| 20 | 0 % | 100 % |

Zusätzlich wurde der Gradientenverlauf der Laufmittel mittels Diagramm auch graphisch dargestellt (Abb. 14).

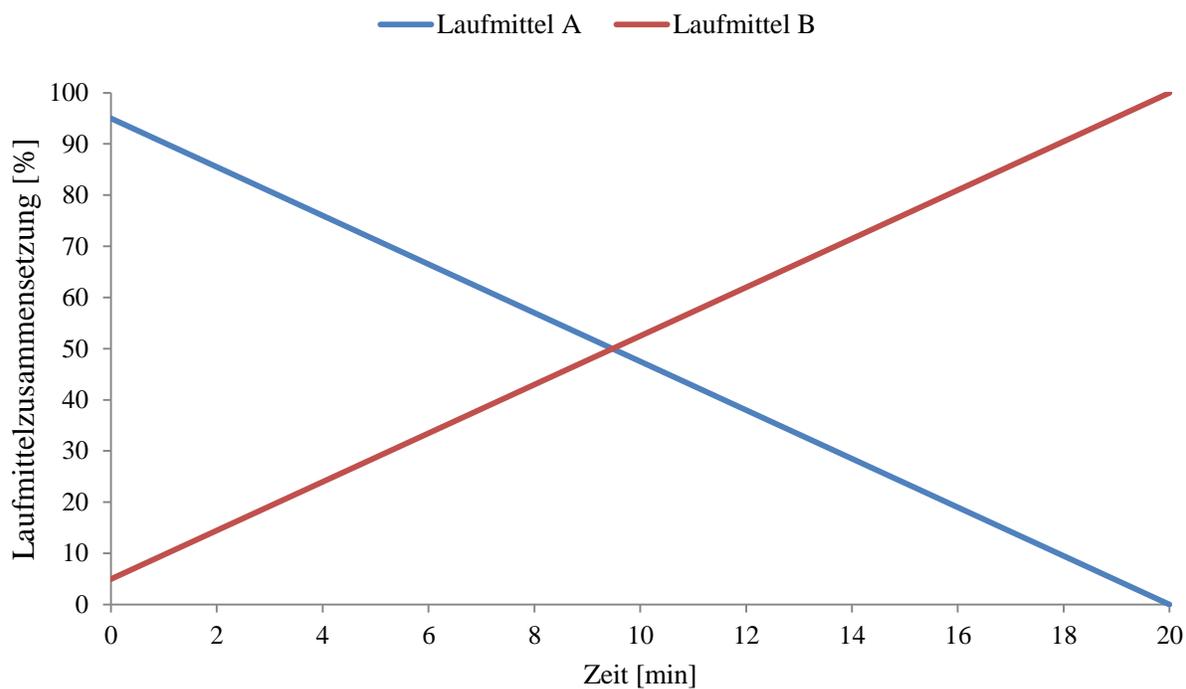


Abb. 14: Gradient des Solventenverlaufes während der Gesamtlauzeit von 20 min

2.2.4 Standard-Kalibrationsgerade

In jedem Messdurchgang wurde zusätzlich eine derivatisierte, unbehandelte Standardprobe mitgeführt. Somit konnten die Peakflächen der analysierten Proben mit denen des Standards bekannter Konzentration abgeglichen werden, sodass eine Kalibrationsgerade bestimmt werden konnte, worauf sich alle Probenergebnisse befanden (Abb. 15).

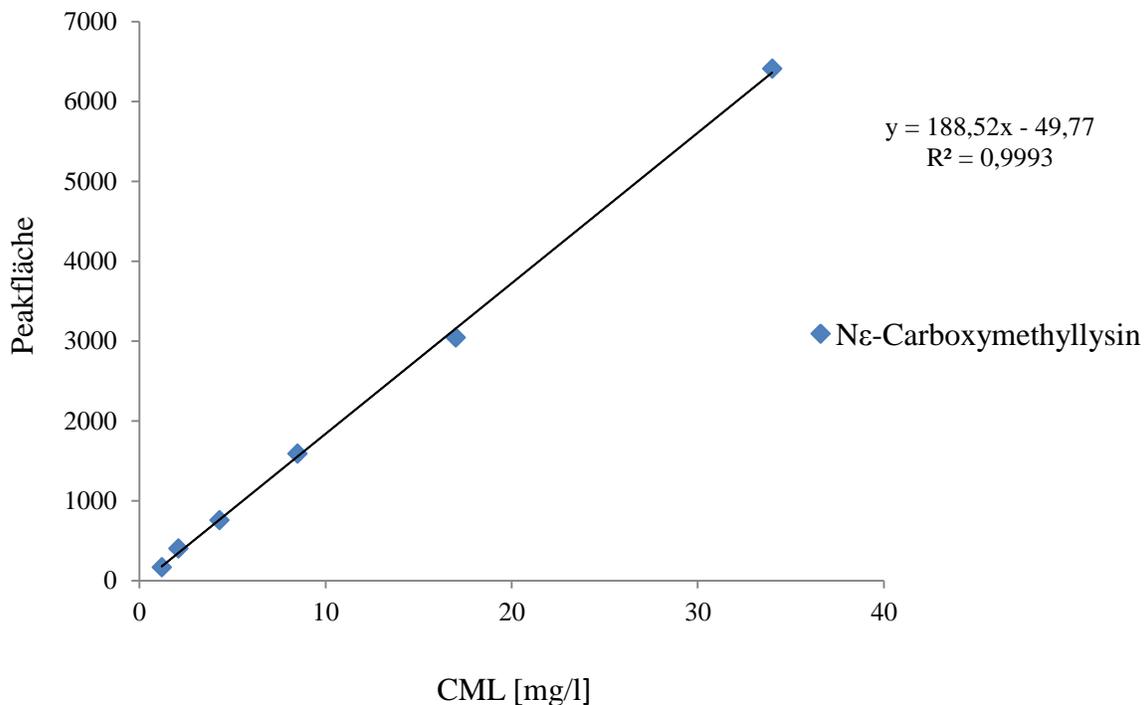


Abb. 15: Kalibrationsgerade N^ε-Carboxymethyllysin. Aufgetragen wurden die ermittelten Peakflächen gegen die jeweiligen Konzentrationen

Als Ausgangskonzentration wurde ein Stock von 0,01 M N^ε-Carboxymethyllysin hergestellt, was bei einem molekularen Gewicht von 204,1 g/mol einer Konzentration von 2,041 g/l entspricht. Diese Ausgangslösung wurde sechsmal im Verhältnis 1:2 mit H₂O zu einer Konzentrationsreihe verdünnt. Der Standard nahm 50 µl des H₂O-Anteiles im Derivatisierungsansatz ein, was im Falle der Ausgangskonzentration im Gesamtvolumen von 1,5 ml einer Konzentration von 68 mg/l

entsprach. Die Ansatzreihe erstreckte sich folglich bis zu 1,2 mg/l CML. Für das Erstellen der Kalibrationsgerade wurde die höchste Konzentration von 68 mg/l aufgrund des für diesen Gebrauch zu hohen Flächenpeaks vernachlässigt.

2.2.5 Chromatogramm des Standards

Zusätzlich wurden die Chromatogramme der Standard-Konzentrationsreihe in einem Diagramm zusammengefasst (Abb. 16). Hierfür wurden alle Konzentrationen des Standards übereinandergelegt.

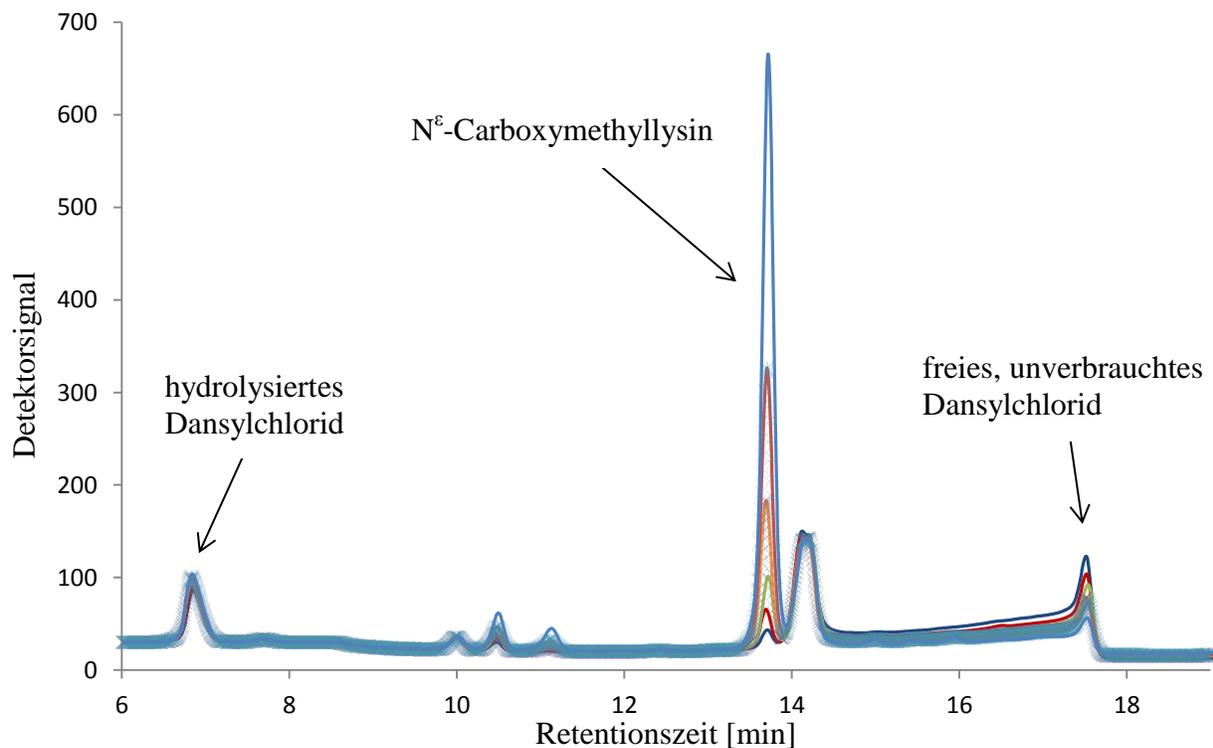


Abb. 16: Chromatogramm der Konzentrationsreihe N^ε-Carboxymethyllysine. Standardkonzentrationen: 34 mg/l, 17 mg/l, 8,5 mg/l, 4,3 mg/l, 2,1 mg/l bzw. 1,2 mg/l. Fluoreszenzdetektion bei E_{EX} 385 und E_{EM} 503 nm. Durchschnittliche Retentionszeit: 13,7 min. Gekennzeichnet wurden weiters rein hydrolysiertes sowie unverbrauchtes Dansylchlorid

3. Ergebnisse & Diskussion

3.1 Probenaufbereitung

Die Methode zur Probenaufbereitung wurde unter anderem einer Studie eines Nestlé-Forschungcenters, in Zusammenarbeit mit einem anderen schweizerischen sowie einem französischen Laboratorium, entnommen [Fenaille et al., 2006]. Dabei wurden auch zusätzliche Versuche durchgeführt, um die jeweiligen Schritte für nachvollziehbar beurteilen zu können.

3.1.1 Reduktion

Wie bereits des Öfteren erwähnt, kann CML im Laufe der Säurehydrolyse zusätzlich durch aufkommende oxidative Spaltung spontan synthetisiert werden (Kapitel 1.4.2.2, Abb. 7). In diesem Vorgang entsteht Hexitolysin, welches in seiner Form nicht mehr weiter zu CML abgebaut werden kann und somit rein das in der Probe ursprünglich vorhandene CML erfasst werden kann [Dunn et al., 1990; Hartkopf et al., 1994]. Um dies veranschaulichen zu können, wurde in einem Versuchsdurchgang ebenso eine nicht-reduzierte Milchprobe (Vollmilch) mitgeführt (Abb. 17).

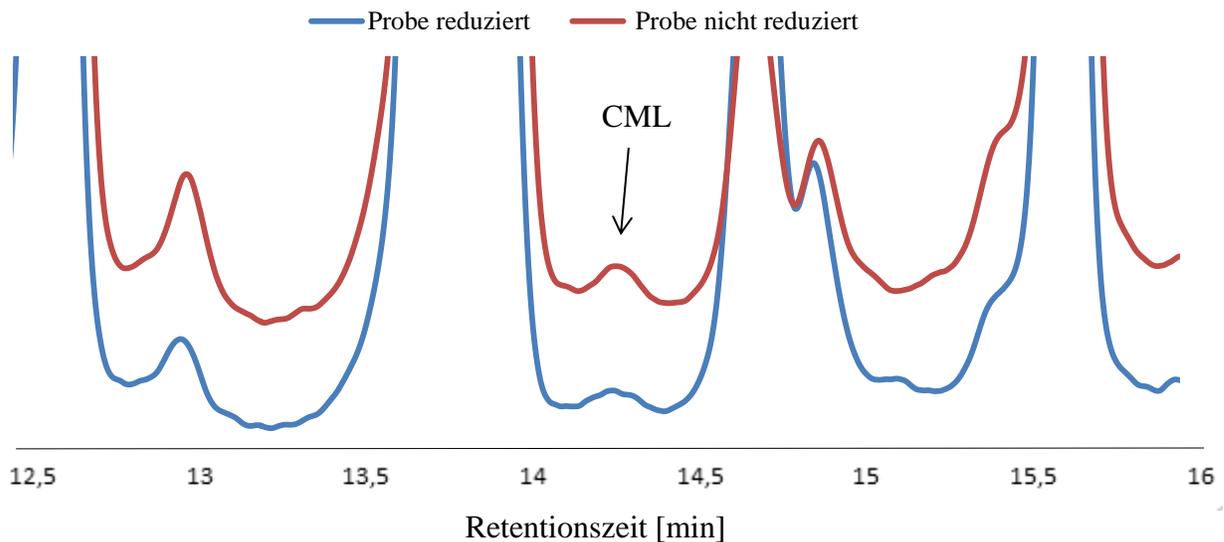


Abb. 17: Vergleich einer reduzierten (blau) mit einer nicht-reduzierten Probe (rot)

Wie man leicht erkennen kann, weist die nicht-reduzierte Probe einen etwas höheren Peak auf. Um dies jedoch genauer festlegen zu können, wurden zusätzlich die Flächen integriert und miteinander verglichen.

Da dieser Versuch an einer anderen HPLC und mittels Diodenarray-Detektor analysiert wurde, kann keine genaue Korrelation bezüglich der Konzentration verglichen zu allen anderen Proben gemacht werden. Der Unterschied allein lässt sich auch hinsichtlich Flächenvergleiches ersichtlich machen (Abb. 18).

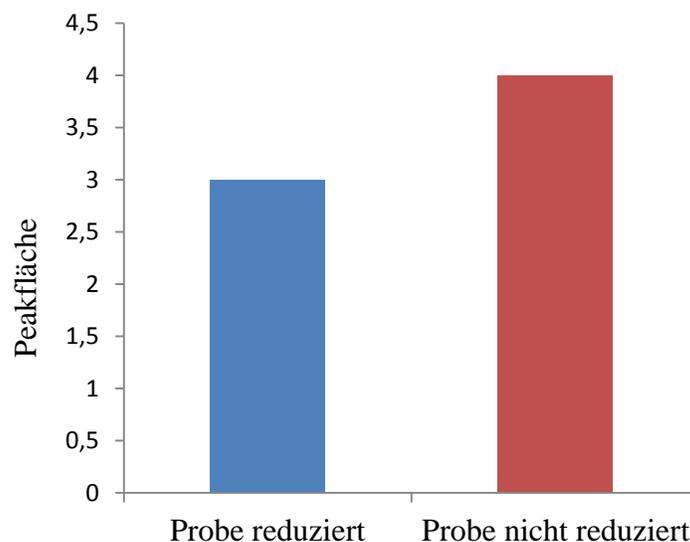


Abb. 18: Direkter Vergleich der erhaltenen Flächen an CML-Konzentration reduzierter sowie nicht reduzierter Probe zueinander

Der Vergleich lässt auf die ursprüngliche Behauptung (Abb. 7) zurückführen. Die Differenz der erhaltenen Flächen beider Proben zeigt jene Menge an CML an, die während der Hydrolyse über Hexitolysin spontan synthetisiert worden ist. Aus diesem Grund wurde bei allen Probanden der Reduktionsschritt durchgeführt, um ausschließlich die bereits im Fertigprodukt angereicherte Menge an CML detektieren zu können.

3.1.2 Präzipitation

Die Präzipitation der Milchproteine erfolgte mittels 10 %-iger Trichloressigsäure (TCA). Hier wurde nach dem Prinzip von *Sanchez, 2001* vorgegangen. In jenem Präzipitationsprotokoll wurde das Prinzip unter Verwendung von konzentrierter TCA beschrieben, wobei für diese Arbeit für die Fällung von Milchproteinen 10 %-ige Säure verwendet wird [Fenaille et al., 2006]. Somit wurde die Vorgehensweise laut Präzipitationsprotokoll beibehalten und die Menge an eingesetzter TCA, für die in dem Fall geringere Konzentration, anhand Versuche ermittelt.

Ein Versuch wurde auch ohne Durchführung einer Präzipitation durchlaufen, wobei somit direkt nach der Reduktion die Säurehydrolyse erfolgte. Hiermit wollte untersucht werden, ob eventuell beim Fällungsschritt vorhandenes CML verloren geht. Da sich jedoch die Menge an vorhandenem Fettanteil in der nicht-gefällten Milchprobe bei den weiteren Aufbereitungsschritten sowie abschließender Analyse als Hindernis darstellte, geschweige denn besseren Ergebnisse erzielte, wurde die Präzipitation im Aufbereitungsschema als fixer Bestandteil beibehalten.

Bei einem Volumen von 250 µl Reduktionsansatz wurde für die Fällung ein Volumen von 200 µl an 10 %-iger TCA hinzugefügt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand nicht gleich verworfen, sondern durch abermalige Vermengung mit TCA auf eine weitere Proteinausfällung getestet; hierbei wurde keine Aggregation bzw. folglich kein vorhandenes Protein sichtbar. Somit blieben 200 µl das Volumen an Fällungsreagenz, welches jeweils dem Reduktionsansatz beigemischt wurde.

3.1.3 Hydrolyse

Für die Säurehydrolyse wurden die gefällten Proteine in 6 M Salzsäure gelöst und für 24 h bei 110 °C im Trockenschrank inkubiert. Dies gilt als eine eher „starke“ Behandlung, da es sich um eine Säurebehandlung mittels sehr konzentrierter Säure handelt.

Es wurden Versuche anhand einer Standardaddition durchgeführt. Dazu wurden mehrere Proben gleichermaßen aufbereitet und nach der Hydrolyse jeweils steigende Mengen an Standard hinzugefügt. Verdünnter Standard ungenauer Konzentration wurde zu jeweils 0, 5, 10 und 15 µl den gleichmäßig zubereiteten Ansätzen beigemischt. Jene Volumina an Standard wurden mit dem

Wasseranteil in den jeweiligen Ansätzen kompensiert. Dies brachte in den Verhältnissen zueinander nachvollziehbare Ergebnisse hervor (Abb. 19).

Folgende zwei Abbildungen sind nur als optische Darstellung und Vergleich zueinander handzuhaben. Diese Messungen wurden zu Beginn der Arbeit durchgeführt und entsprechen somit die noch nicht optimierten Parameter. Zusätzlich wurde für diesen Versuch kein Fluoreszenz-, sondern ein UV-Detektor verwendet und die Analyten bei einer Wellenlänge von 360 nm gemessen.

Zur besseren Übersicht wurden die Peakflächen in ein separates Diagramm gegeneinander aufgetragen (Abb. 20).

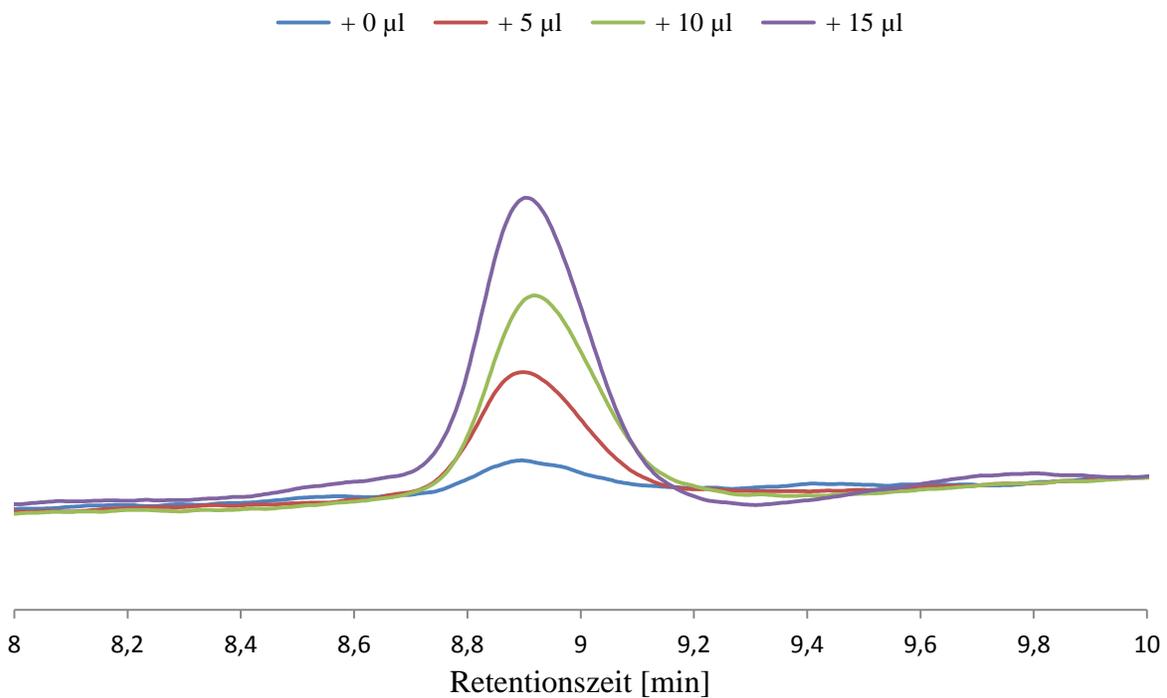


Abb. 19: Standardaddition gleichmäßig aufbereiteter Proben. Zugesezt wurden 0, 5, 10 bzw. 15 µl verdünnter Standard ungenauer Konzentration nach vollzogener Hydrolyse und anschließender Stickstofftrocknung

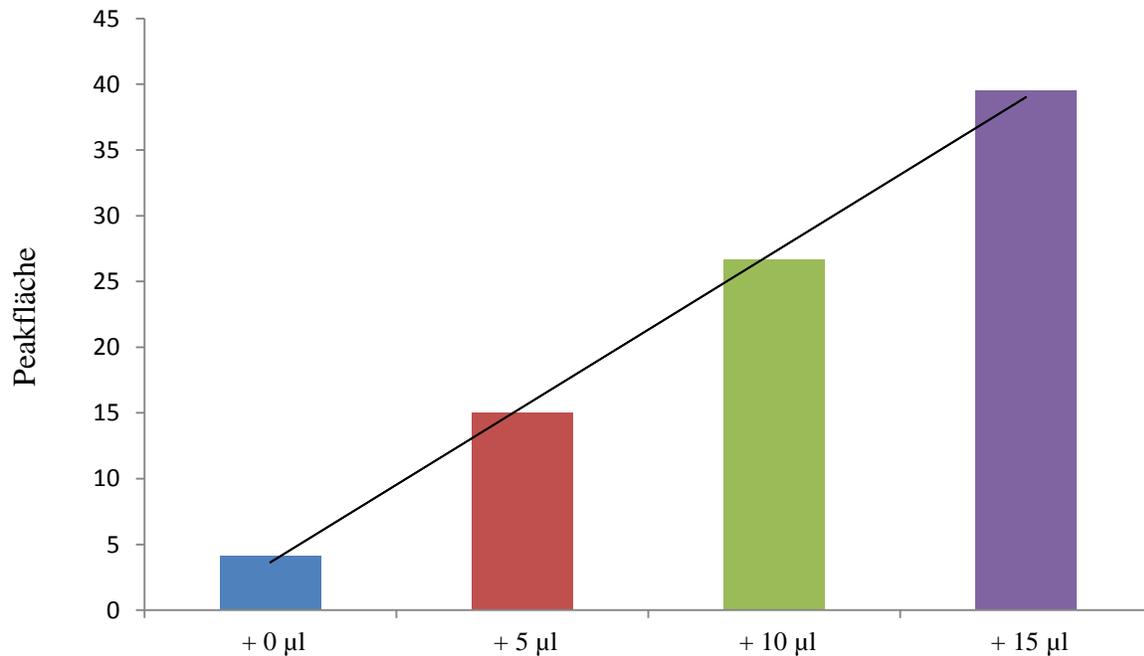


Abb. 20: Standardaddition von 0, 5, 10 bzw. 15 µl nach Säurehydrolyse. Zusätzlich wurde eine Trendlinie durch alle Punkte gelegt, um die Linearität besser zu veranschaulichen

Der gleiche Versuch wurde wiederholt durchgeführt, wobei aber die Standardaddition bereits beim Reduktionsansatz erfolgte und somit weiters auch den Prozessen der Fällung und Hydrolyse ausgesetzt wurde. Hier zeigten die Ergebnisse keinerlei Unterschied an analysierter Menge an CML. Der Schritt der Reduktion wurde folglich ausgelassen, da der Standard, also freies CML, bei der Präzipitation nicht mit den Milchproteinen mit ausfällt und somit im Überstand verbleibt bzw. mit verworfen wird.

Aufgrund dessen wurden weitere Untersuchungen unternommen, um aufzuklären, in bzw. vor oder nach welchem Schritt das CML in der Probenaufbereitung verloren geht. Dazu wurde die jeweils gleiche Konzentration an Standard einerseits vor und andererseits in einer anderen gleich behandelten Probe nach der Hydrolyse zugesetzt. Zusätzlich wurde ebenso dieselbe Menge an Standard ohne Probe ausschließlich hydrolysiert und wie in jedem Durchgang ein derivatisierter, ansonsten unbehandelter Standard als Referenz mitgeführt (Abb. 21).

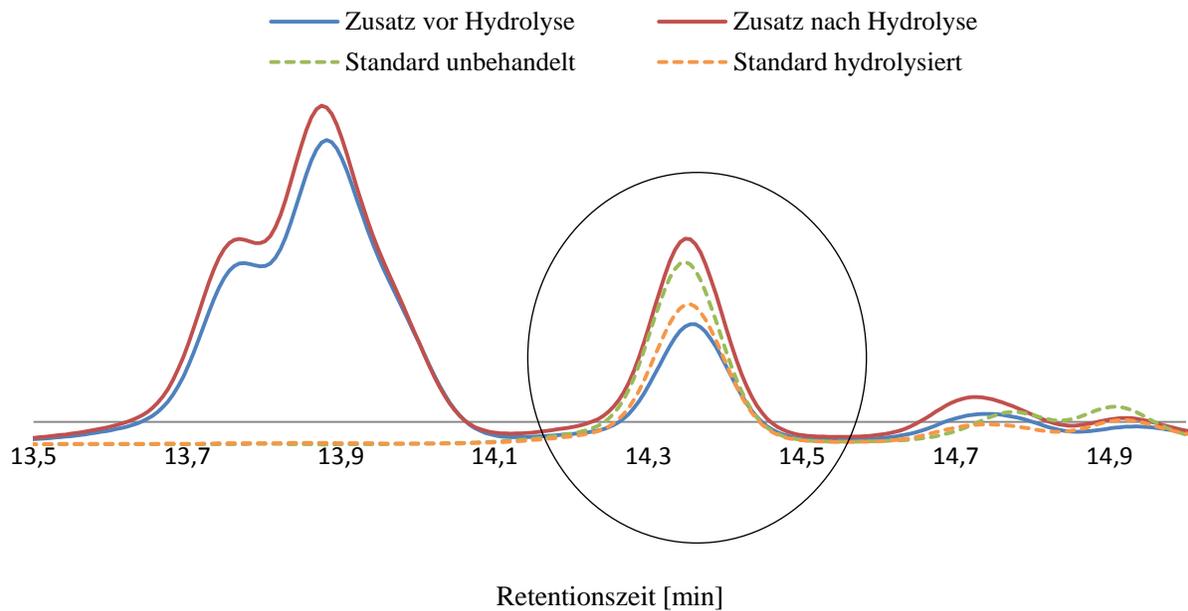


Abb. 21: Darstellung der Proben, in denen der Standard zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugesetzt wurde (vor bzw. nach Hydrolyse) und ebenfalls reiner, hydrolysierter sowie ausschließlich derivatisierter Standard als Vergleich

Zur zusätzlichen Übersicht wurden die Flächen gegeneinander anhand eines Säulendiagrammes aufgetragen und direkt miteinander verglichen (Abb. 22).

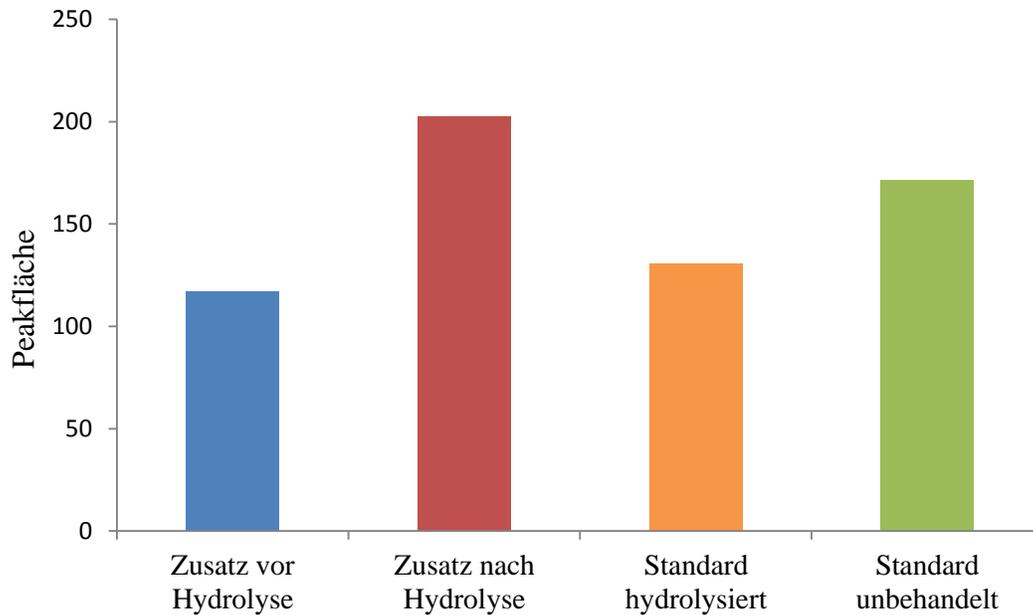


Abb. 22: Direkter Vergleich der erhaltenen Flächen zueinander

Wie in Abb. 21 und 22 erkennbar, ist deutlich weniger CML in jener Probe vorhanden, in welcher der Standard vor der Hydrolyse zugefügt wurde, verglichen zur Probe mit dem Standardzusatz nach der Hydrolyse. Vergleicht man die Flächen miteinander, weist dies einen Verlust von beinahe die Hälfte der Gesamtkonzentration an vorhandenem CML auf. Ebenfalls der Vergleich beider unterschiedlich behandelten Standards zeigt einen ersichtlichen Unterschied zueinander, jedoch zu einem niedrigeren Verhältnis. Zum direkten Vergleich aller Proben wurde bei jedem Probanden die gleiche Menge an Standard verwendet.

Dieser Versuch zeigt, dass während der Säurehydrolyse ein Teil an CML verloren geht. Vermutlich ist der Vorgang solch einer Hydrolyse mit einer Säure von hoher Konzentration ein etwas aggressiveres Verfahren, was offensichtlich etwaige Folgen nach sich ziehen kann. Für die Aufbereitung kann dieser Schritt wiederum nicht vernachlässigt werden, da in diesem Verfahren die enthaltenen Aminosäuren im Proteingemisch freigesetzt werden, um sie für die Analyse zugänglich zu machen. Wie aber der direkte Vergleich der Proben miteinander auch zeigt, ist die Menge an Verlust eher willkürlich; was die Analysenauswertung erheblich erschwert. Hiermit wurde auch festgestellt, dass mit etwaigen Flächenunterschieden unter denselben Proben gehandhabt werden muss. Darum wurde beschlossen, pro Milcherzeugnis eine Dreifachbestimmung durchzuführen, um aus mehreren Werten einen Gesamtwert zu mitteln.

3.1.4 Derivatisierung

Wie bereits erwähnt, wurde für diese Arbeit ein Fluoreszenzdetektor zur Analyse der Proben verwendet. Er findet durch seine hohe sensitive und selektive Detektion weit verbreiteten Einsatz. Um Analyten optimal über Fluoreszenz detektierbar machen zu können, muss eine Derivatisierung vorgenommen werden. Als Reagenz hierfür wurde Dansylchlorid verwendet, welches eine stabile, fluoreszierende Verbindung mit dem Analyten eingeht und gleichzeitig eine günstige Variante verglichen zu anderen Derivatisierungsreagenzien darstellt.

Es stellte sich heraus, dass der richtige Umgang mit dem Reagenz erst ausgetestet werden musste. Zu Beginn wurde versucht den Derivatisierungsvorgang unter Hitzeeinwirkung durchzuführen, da davon ausgegangen wurde, dass die Dansylchlorid-Reaktion erst unter Einwirkung von Wärme zum Ablaufen kommt. Dazu wurden für die Derivatisierung die Standardproben bei 70

°C im Heizblock inkubiert. Die anschließende Analyse zeigte jedoch die gegenteilige Wirkung, da mit der Derivatisierungszeit kleinere Peakhöhen bzw. -flächen zum Vorschein kamen (Abb. 23, 24). Vermutlich wurde durch die Hitzeeinwirkung eine Zersetzung und somit Hydrolyse der gebildeten Derivate hervorgerufen. Derivate, welche bei Raumtemperatur gebildet wurden, zeigten vergleichsweise bessere Ergebnisse in den erhaltenen Chromatogrammen.

Weiters wurde auch die optimale Dauer des Derivatisierungsvorganges getestet, wobei Standardproben unterschiedlich lange derivatisiert und die Ergebnisse miteinander verglichen wurden. Hierbei wurde eine Dauer von 30 min als Optimum ermittelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Proben sofort in den auf 4 °C gekühlten Autosampler der HPLC gestellt.

Ebenso die Zusammensetzung des Derivatisierungsansatzes wurde anschließend mehrmals überarbeitet. Laut einer aufgefundenen Quelle wurden mittels Dansylchlorid derivatisierte Weinproben beispielsweise mittels Zusatz von Salzsäure gelöst; da jedoch im Laufe der Arbeit herausgefunden wurde, dass eine erfolgreiche Derivatisierungsreaktion mit Dansylchlorid nur im basischen Milieu ablaufen kann [Moret et al., 1994; Wood-Rethwill & Warthesen, 1980] (siehe Kapitel 2.1.3.4), musste hierfür eine alternative Lösung gefunden werden. Vorerst wurde anhand einiger Versuche ausgetestet, erst nach vollständiger Zubereitung des Derivatisierungsansatzes jenen durch anschließende Überschusszugabe von Natriumcarbonat auf einen basischen pH-Wert zu bringen. Dies brachte jedoch keine brauchbaren Ergebnisse, wobei letztendlich die Salzsäure weggelassen bzw. zur Gänze durch Natriumcarbonat ersetzt wurde. Somit wurde ein pH-Wert von > 8 und folglich reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Auch zusätzliche Komponenten wie Aceton im Derivatisierungsansatz wurden umstritten; diese wurden letztendlich ebenso gänzlich vernachlässigt. Weiters wurde mittels einiger Testdurchläufe auf eine adäquate Menge an Dansylchlorid je Ansatz geprüft. Hierbei wurde auf eine ausreichende Menge bzw. Überschuss an Reagenz entschieden, welcher die exakt gleiche Menge wie das eigentliche Probenvolumen und somit die Hälfte des gesamten Ansatzes einnimmt. Somit konnte eine vollständige Derivatisierung vorhandenen Analytes gewährleistet werden.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass die Stabilität des Derivates nicht von allzu langer Dauer ist, außer man friert die Proben bei -20 °C ein. Deutlich wurde dies vor allem beim Vermessen aller Proben hintereinander in deinem Durchgang, wobei der Standard auch erst am Ende eingespritzt wurde. Dieser ganze Prozess nahm eine Dauer von etwa 8 Stunden ein. Besonders der Vergleich des Standards, der bis zum Zeitpunkt der Messung bereits 8 Stunden in den 4 °C kühlen

Autosampler der Vials verharrte, mit einem frisch injizierten Standard gleicher Konzentration gab ersichtlichen Aufschluss darüber. Auch bereits nach 3,5 h zeigte sich anhand anderen Versuchsdurchlaufes eine deutliche Abnahme. In Abb. 25 wurden alle genannten Beispiele nebeneinander aufgezeigt.

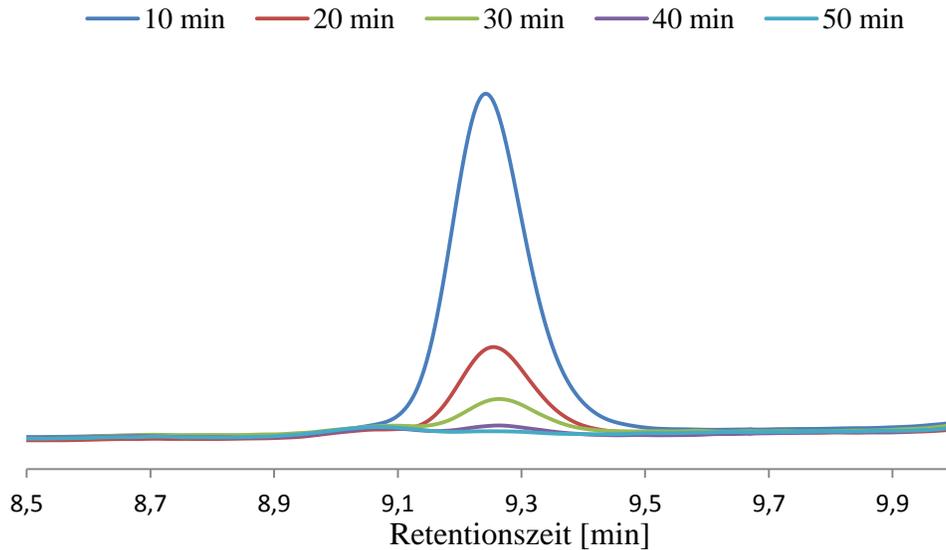


Abb. 23: Derivatisierung bei 70°C für eine Dauer von 10, 20, 30, 40 bzw. 50 min

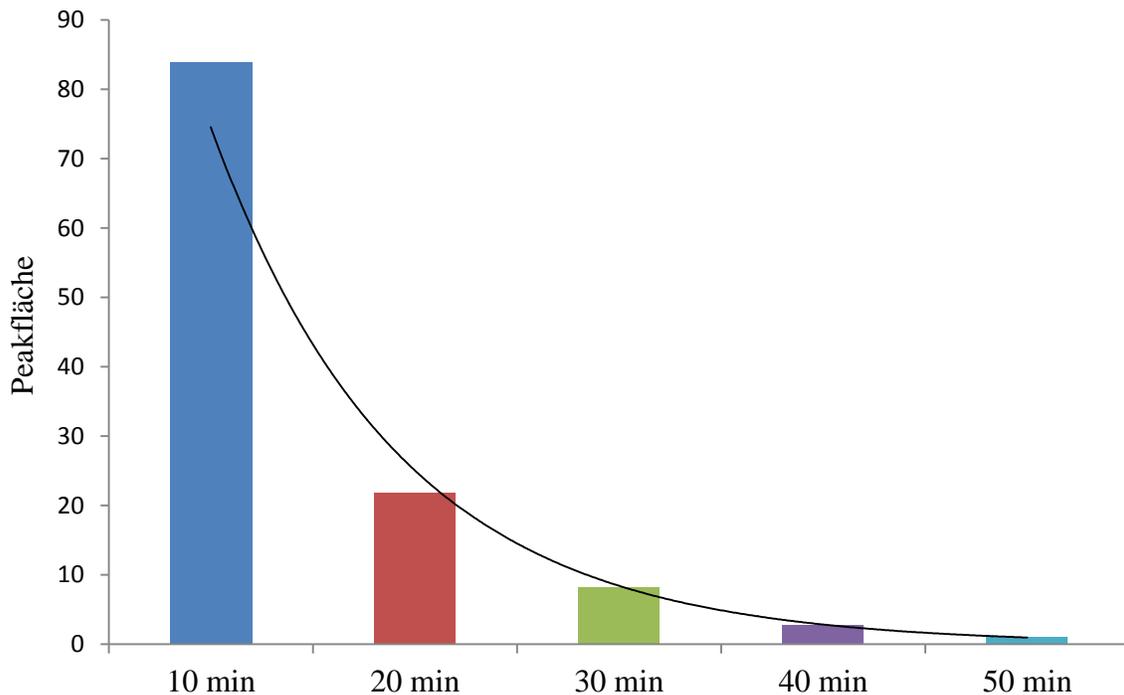


Abb. 24: Flächenvergleiche der Derivatisierungen bei 70°C für 10, 20, 30, 40 bzw. 50 min. Zur Veranschaulichung der Abnahme wurde zusätzlich eine exponentielle Trendlinie durch die entsprechenden Punkte gelegt

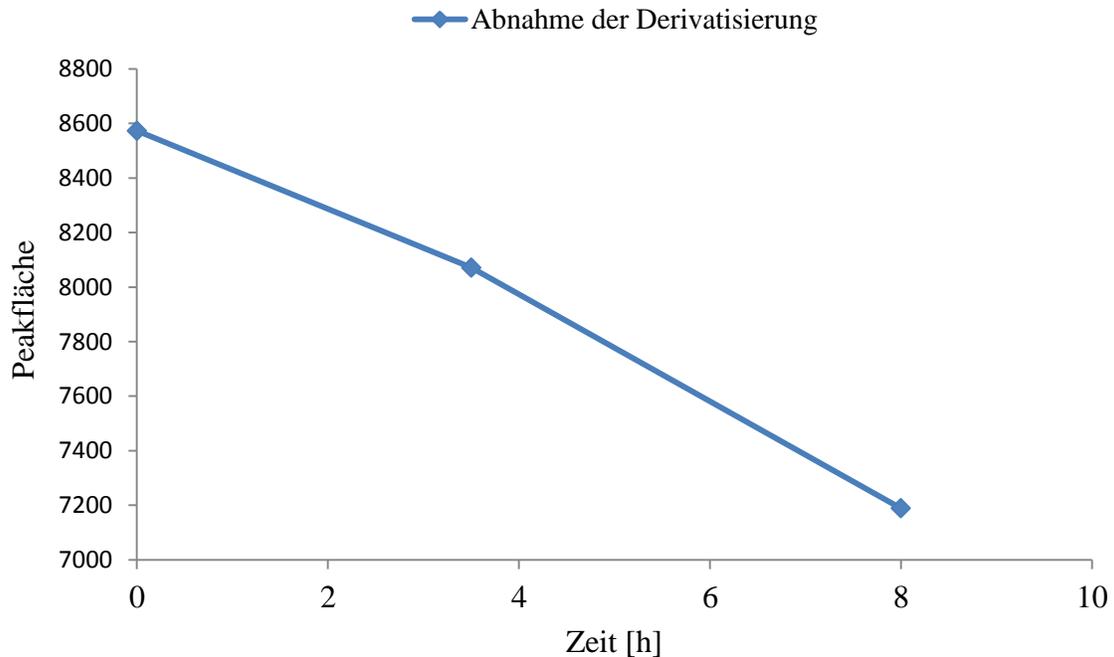


Abb. 25: Abnahme der Derivatisierung anhand Vergleiches von Standards gleicher Konzentration nach 0, 3,5 bzw. 8 h Aufbewahrung in dem 4 °C kühlen Autosampler

Aufgrund dessen mussten Lösungswege bedacht werden, um dem Lösen der Derivate zuvorzukommen. Darum wurde weiters auf das Vermessen von mehreren Proben hintereinander verzichtet und somit die Proben erst bei Start der Messung in den Autosampler gestellt. Die Proben wurden aus Gruppen zu je einer Dreifachbestimmung bereitgestellt und sofort vermessen. Unterschiede zu den „alten“, in einem Durchgang vermessenen Proben, sind deutlich erkennbar (Abb. 26).

Die betreffenden Produkte wurden für den Vergleich zur Hand genommen. Hierbei wurden die jeweiligen Dreifachbestimmungen in unterschiedlicher Reihenfolge und Stehzeit in einem Durchgang hintereinander vermessen („alt“ in Abb. 26), der Überschuss der gesamten Proben sofort einzeln bei -18 °C eingefroren und beim nächsten Versuch erst kurz vor Start der Messung aufgetaut und bereitgestellt („neu“). Die ersten Ergebnisse der pasteurisierten Vollmilch wurden vernachlässigt, da bei der Herstellung Komplikationen auftraten; darum wurde der Vergleich dieser Produkte übergangen. Alle anderen Produkte zeigen demnach nachvollziehbare Ergebnisse. Die Dreifachbestimmungen wurden jeweils zu einem Ergebnis gemittelt und gegenübergestellt.

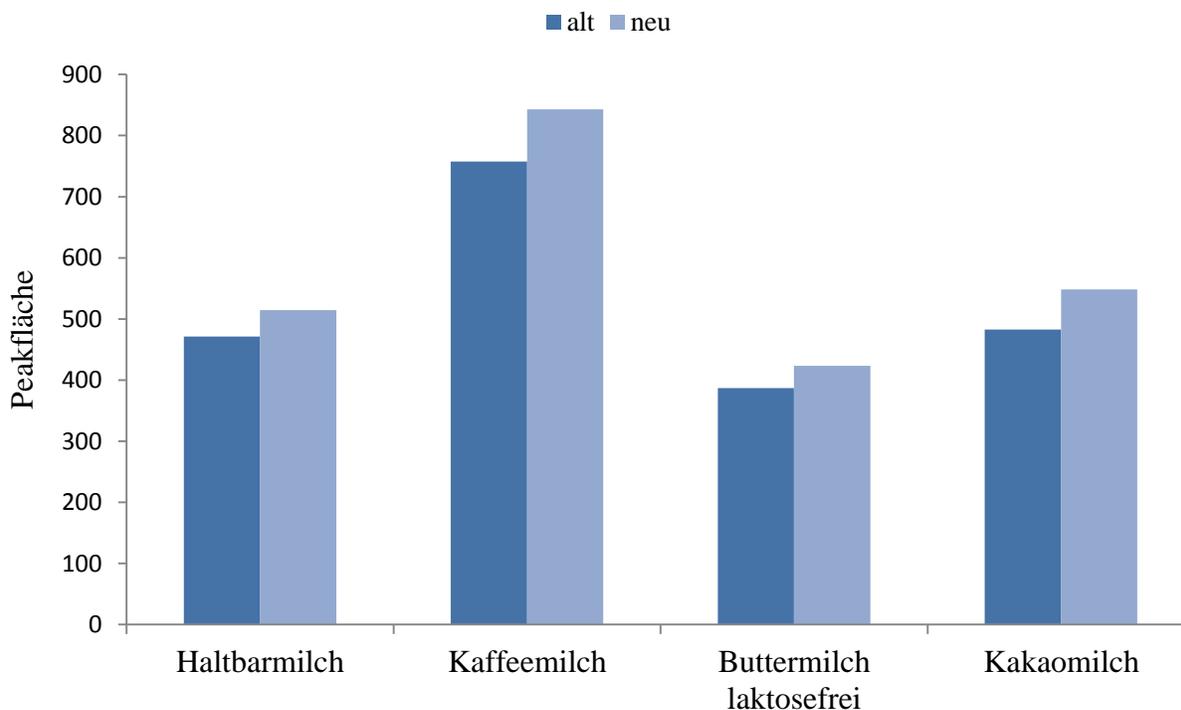


Abb. 26: Vergleich derselben Proben, einerseits sofort (neu), andererseits nach einiger Zeit Verweildauer nach vollzogener Derivatisation (alt) vermessen

Schnelles und sorgfältiges Arbeiten ist somit von höchster Priorität im Umgang mit Derivatisierungsreagenzien wie Dansylchlorid. Auch auf die Kühlung des Autosamplers der HPLC-Vials muss hierbei geachtet werden.

3.2 Analyse mittels RP-HPLC

Durch Vergleich mit dem Standard über dessen Retentionszeit konnte der gewünschte Analyt, N^ε-Carboxymethyllysine, in den zu analysierenden Proben auffindig gemacht werden. Auch weitere charakteristische Peaks, wie hydrolysiertes oder unverbrauchtes Dansylchlorid, wurden mittels Versuche und Vergleiche auffindig gemacht. Jedoch mussten hierfür, um ein reproduzierbares Ergebnis und optimale Chromatogramme zu erhalten, einige Durchläufe durchgeführt werden.

Die Zusammensetzung des Laufmittels wurde von Beginn an beibehalten, sowie Methanol als zweite Komponente der mobilen Phase. Mehrmaliges Wechseln der Säule erschwerte diesen

Standardisierungsprozess; die Gradienteneinstellung sowie alle Messparameter mussten mit jedem Mal neu angepasst werden. Weiters musste eine geeignete Anpassung des Fluoreszenzdetektors erfolgen. Der korrekte Bereich der Extinktion und Emission sowie der sogenannte PMT-Gain mussten hierbei definiert werden. Auch Hindernisse wie Retentionszeitshifts oder Verschiebungen der Basislinie erschwerten die Analyse. Bei der verwendeten Säule aller Probanden dieser Arbeit zeigte häufig die erste Messung eine geringe Versetzung der Basislinie nach oben hin, wonach sich die folgenden Messungen schließlich auf eine einheitliche Höhe einfanden (Abb. 27).

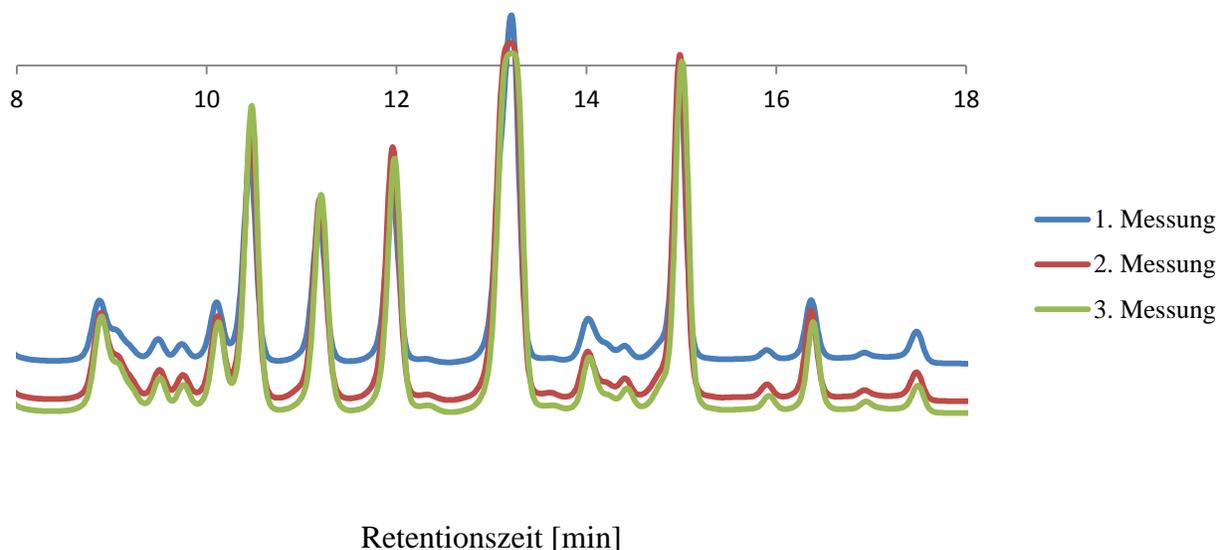


Abb. 27: Vergleich dreier Messungen, hintereinander eingespritzt. Nicht vollständig angepasster PMT-Gain sowie Verschiebungen der Basislinie werden hier aufgezeigt

Abb. 27 veranschaulicht einerseits Verschiebungen der Basislinie, sowie nicht korrekt angepasste Einstellungen des Fluoreszenzdetektors. Die erhaltenen Peakflächen wurden im negativen Bereich angezeigt, was durch ungenaues Festsetzen der Photomultiplier-Einstellungen (PMT-Gain) im Fluoreszenzsignal begründet werden kann. Dies erklärt auch, dass die Horizontalachse hier im oberen Bereich des Diagrammes festgelegt wurde.

3.3 Probenauswertung

Zur Probensammlung zählen verschiedenste Milcherzeugnisse wie zum Beispiel handelsübliche Vollmilch, Kaffee- oder auch Kakaomilch. Genauer ist in der Probenbeschreibung in Kapitel 2.1.1 aufgezeigt.

3.3.1 Ermittlung der Ergebnisse

Wie bereits erwähnt, wurde je Milcherzeugnis eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um auf ein nachvollziehbares Ergebnis zu kommen. Aus den daraus folgenden Werten wurde schnell festgestellt, dass trotz Verwendung des exakt gleichen Produkts für die gesamte Dreifachbestimmung bei gewissen Proben etwaige Streuungen bezüglich der Messergebnisse zum Vorschein kamen. Der langwierige Prozess der Probenaufbereitung ließ dies jedoch auch nicht einfach gestalten.

Zur Veranschaulichung werden in den nächsten Abbildungen die Dreifachbestimmungen jedes Milcherzeugnisses inklusive Mittelwerte dargestellt (Abb. 29 – 33). Da sich die meisten Proben im nahezu gleichen Peakflächen-Bereich befanden, wurde zur besseren Übersicht jede Dreifachbestimmung inklusive Mittelwert als separates Diagramm dargestellt. Beibehaltung einer einheitlichen Achsenskalierung diente hierbei zum besseren Vergleich zueinander.

Zuvor wird ein Chromatogramm als Beispiel eines Probendurchlaufes dargestellt. Hierfür wurde die Dreifachbestimmung der Haltbarmilch zur Hand genommen (Abb. 28).

Es wurde deshalb nicht jede einzelne Messung als Chromatogramm dargestellt, da diese sich sehr ähneln bzw. alle nahezu gleich aussahen.

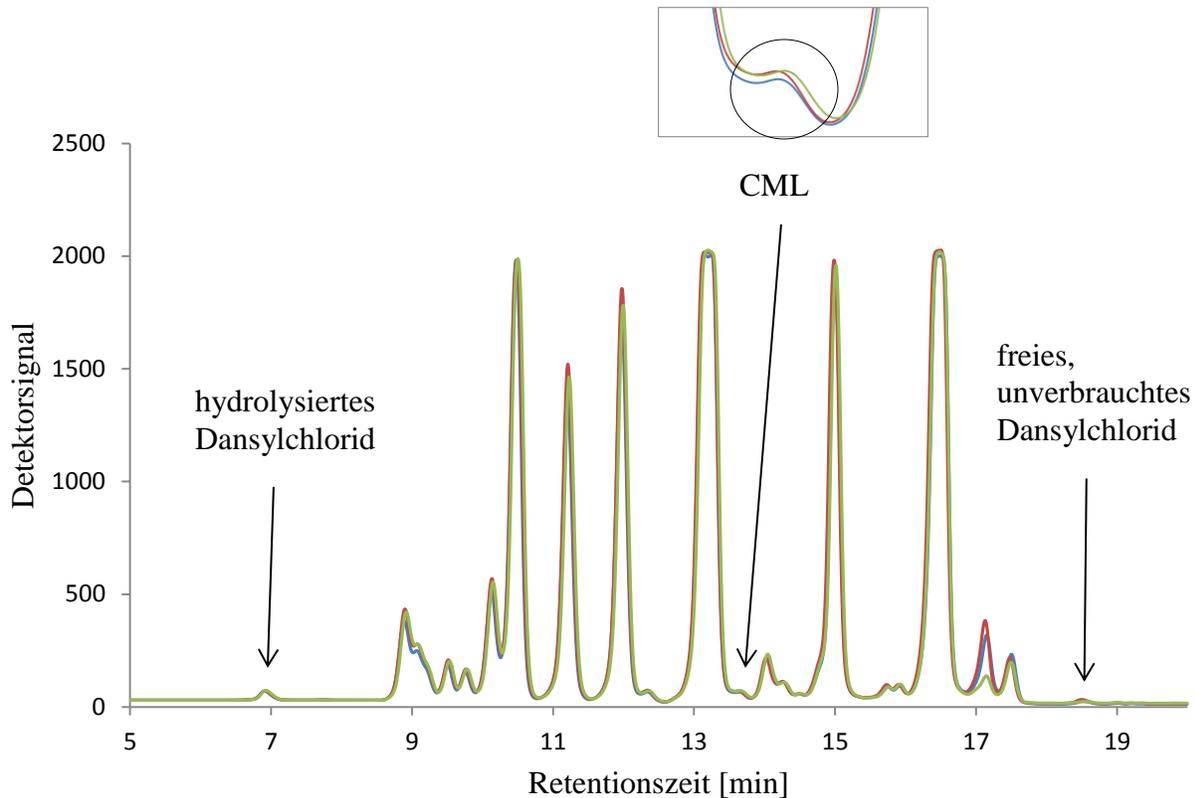


Abb. 28: Übereinandergelegte Chromatogramme der Haltbarmilch-Dreifachbestimmung. CML wurde zur besseren Veranschaulichung separat vergrößert dargestellt. Gekennzeichnet wurden ebenso hydrolysiertes und freies Dansylchlorid

Da bis zur Minute 5 keine weiteren Signale detektiert wurden, wurde zur besseren Übersicht die x-Achse erst hier begonnen. Ebenso wurde auch der Peak des zu analysierenden N^ε-Carboxymethyllysins in eine separate, kleine Abbildung an der Oberseite des Chromatogramms vergrößert dargestellt.

Vergleicht man die erhaltenen Peaks für hydrolysiertes und freies Dansylchlorid mit jenen von Abb. 16, der Konzentrationsreihe des Standards, fällt einem vorrangig ein erheblicher Unterschied diesbezüglich auf; die Konzentrationsreihe weist allgemein viel größere Peaks auf, auch unter Rücksichtnahme der unterschiedlichen Skalierung der maximalen Peakflächen-Range der y-Achse (2 500 vs. 600). Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Chromatogramm der Proben mehrere Peaks und somit mehr Bindungskomponenten für das Dansylchlorid beinhaltet. Somit wurde die eingesetzte Menge bei den Proben nahezu verbraucht. Solche Bindungspartner sind beispielsweise andere Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten.

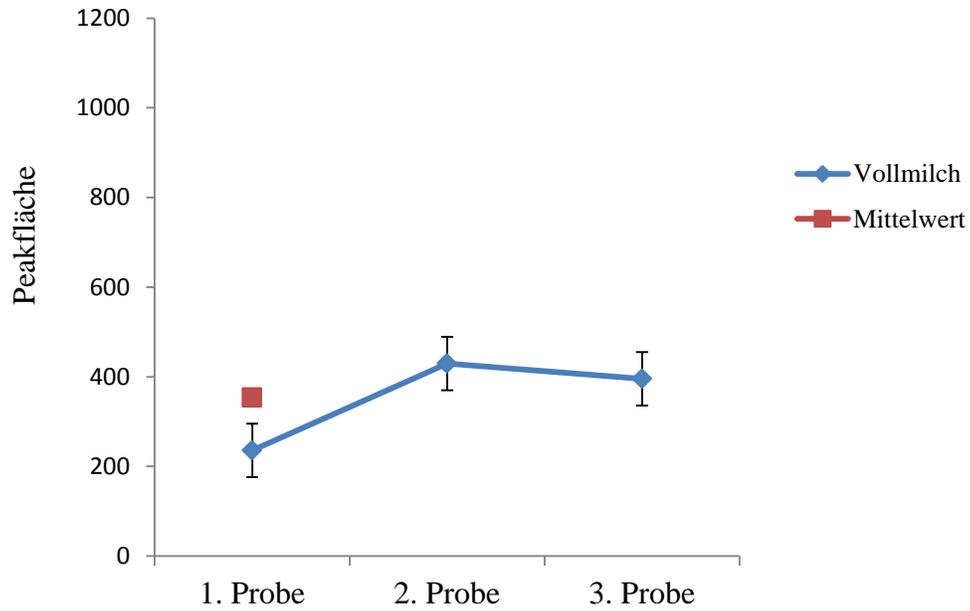


Abb. 29: Werte aller Vollmilchproben inklusive Mittelwert. Fehlerindikatoren mit Standardfehler verdeutlichen den Umfang der Streuung

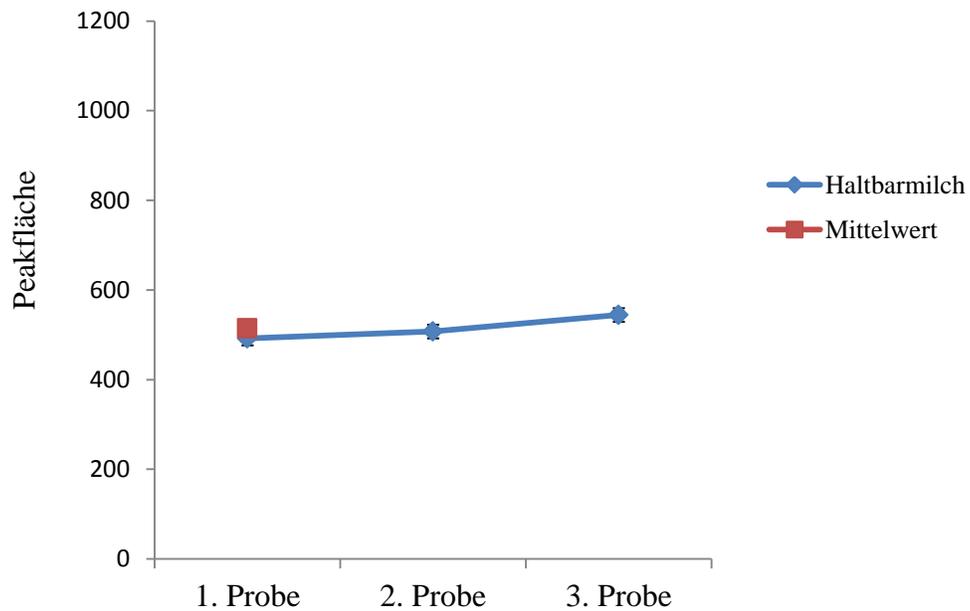


Abb. 30: Werte aller Haltbarmilchproben inklusive Mittelwert. Fehlerindikatoren mit Standardfehler verdeutlichen den Umfang der Streuung

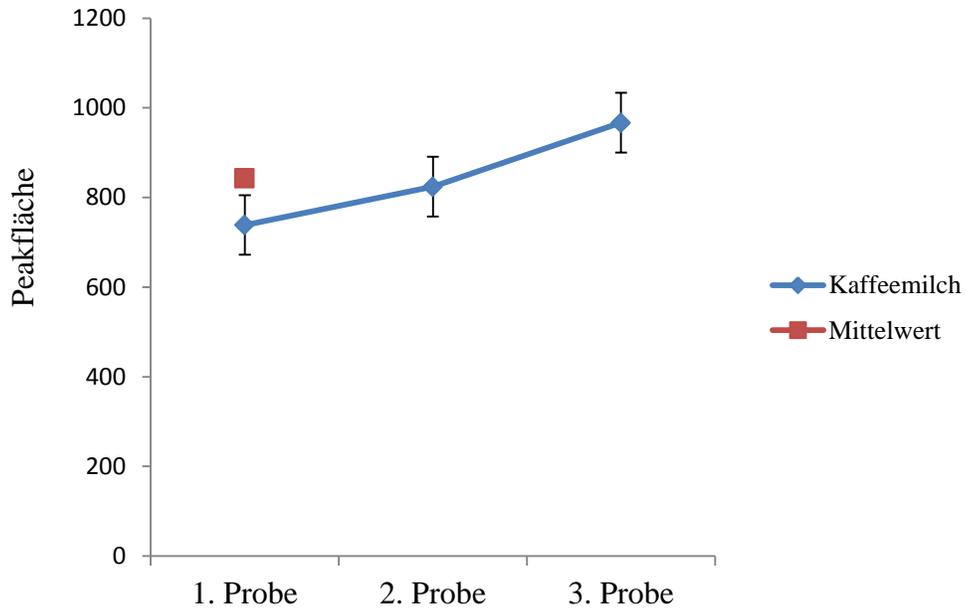


Abb. 31: Werte aller Kaffee Milchproben inklusive Mittelwert. Fehlerindikatoren mit Standardfehler verdeutlichen den Umfang der Streuung

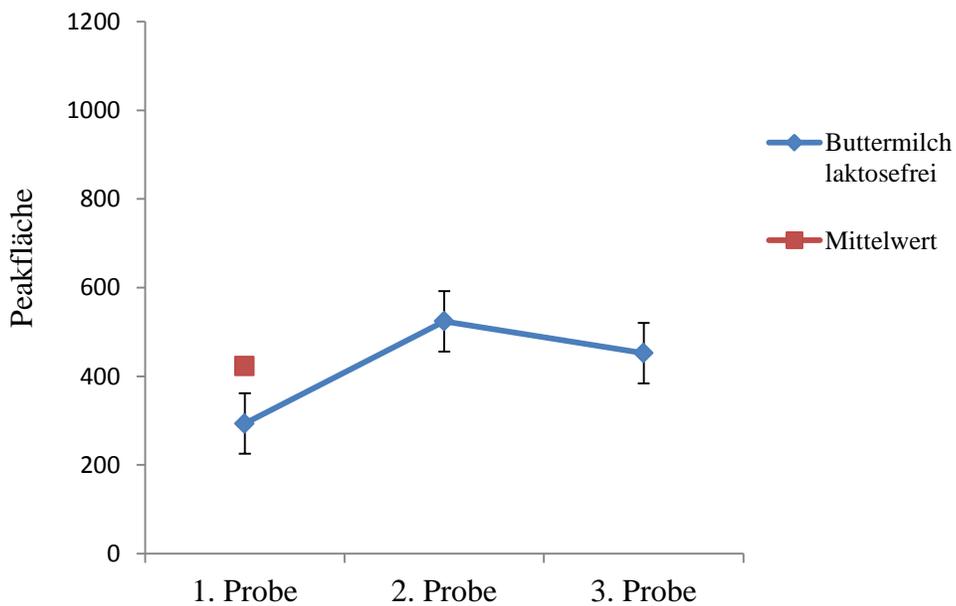


Abb. 32: Werte aller Buttermilchproben inklusive Mittelwert. Fehlerindikatoren mit Standardfehler verdeutlichen den Umfang der Streuung

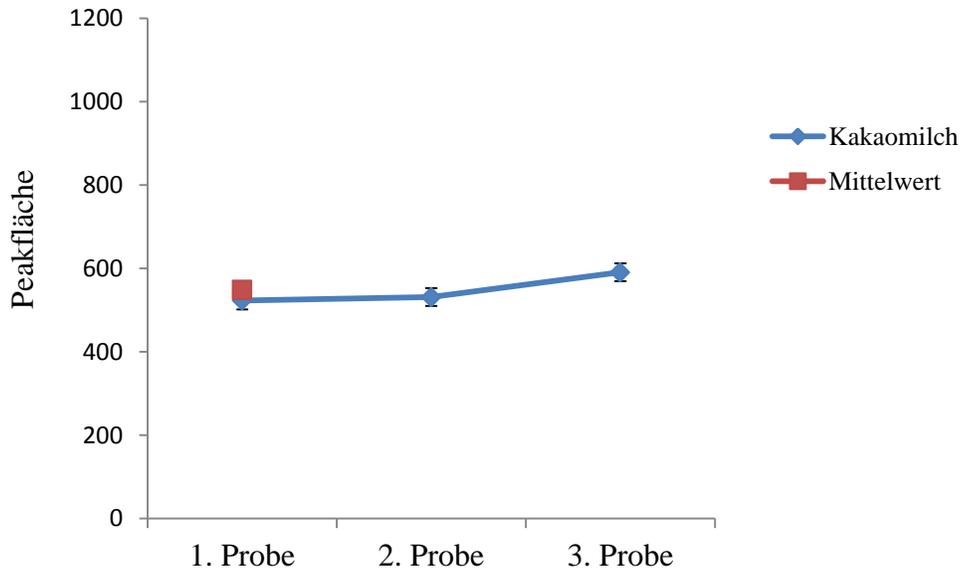


Abb. 33: Werte aller Kakaomilchproben inklusive Mittelwert. Fehlerindikatoren mit Standardfehler verdeutlichen den Umfang der Streuung

Zur besseren Übersicht wurden in Abb. 34 alle erhaltenen Mittelwerte zu einem Diagramm zusammengefasst.

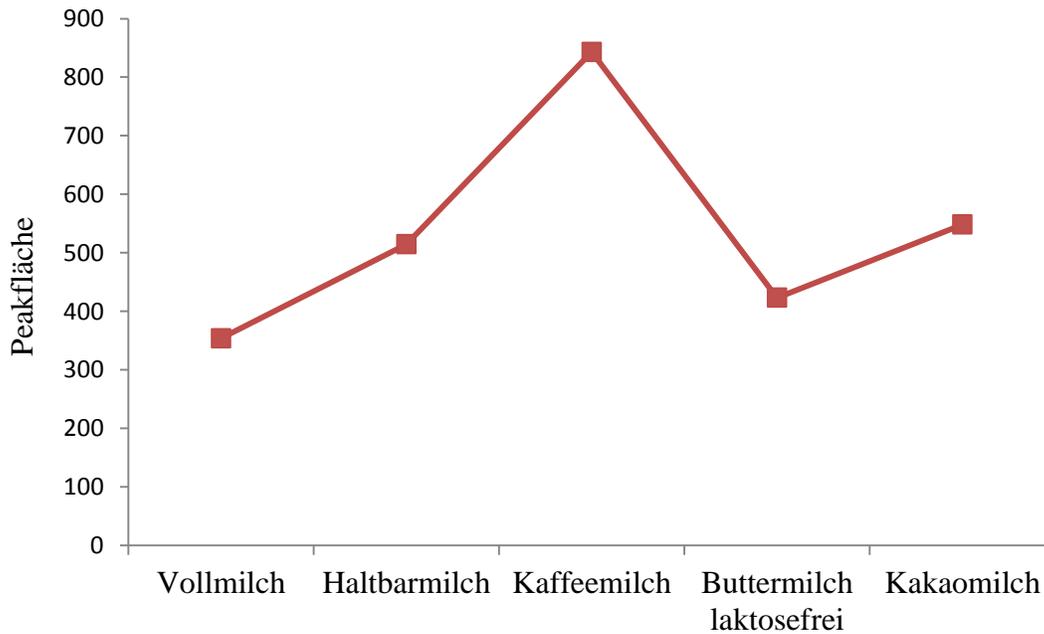


Abb. 34: Zusammenfassung der erhaltenen Peakflächen-Mittelwerte aller Milcherzeugnisse

Die Geradengleichung der Kalibrationsgerade verhalf zur Berechnung der mg/l CML enthalten in jedem Produkt. Um die gewünschte Konzentration mg CML pro 100 g Protein zu erhalten, mussten die Werte weiters mit dem Proteingehalt des jeweiligen Milcherzeugnisses übereingestimmt werden (Tab. 12). Der Proteingehalt der jeweiligen Produkte wurde den Angaben der Hersteller entnommen.

Tab. 12: Übersicht der berechneten Konzentrationsergebnisse

| Produkt | CML [mg/l] | Protein [g/100 ml] | CML [mg/100 g Protein] |
|-------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Vollmilch | 2,14 | 3,4 | 6,30 |
| Haltbarmilch | 2,99 | 3,3 | 9,07 |
| Kaffeemilch | 4,74 | 6,5 | 7,29 |
| Buttermilch laktosefrei | 2,51 | 3,6 | 6,97 |
| Kakaomilch | 3,17 | 3,6 | 8,81 |

Zusammenfassend werden die erhaltenen Konzentrationen an CML in mg/100 g Protein in folgender Abbildung angegeben.

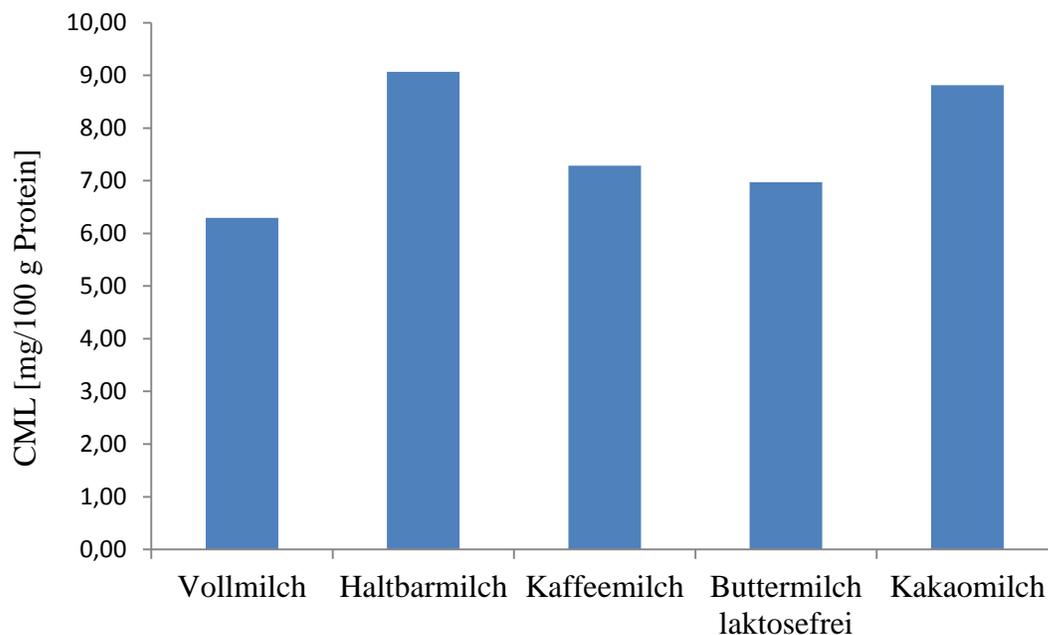


Abb. 35: CML-Konzentrationen der analysierten Milcherzeugnisse in mg/100 g Protein

3.3.2 Vergleich der Ergebnisse

Abb. 29 – 33 zeigen die jeweiligen Dreifachbestimmungen inklusive Mittelwert. Das Augenmerk liegt hier auf dessen Streuung; manch Einige zeigen eine größere, andere eine kleinere Verteilung untereinander. Hierbei zeigen Vollmilch, Kaffee- und die laktosefreie Buttermilch die größte erkennbare Streuung (Abb. 29, 31, 32), verglichen zur Haltbar- und Kakaomilch (Abb. 30, 33).

Die Kaffeemilch von SPAR weist weiterhin auch die allgemein größte erreichte Peakflächenkonzentration auf (Abb. 34). Wobei, werden diese Werte auf die der eigentlichen Konzentration in mg CML/100 g Protein umgerechnet, nehmen die Ergebnisse wieder eine andere Reihenfolge ein. Kaffeemilch enthält beispielsweise nahezu doppelt so viel Menge an Protein wie die restlichen Produkte (Tab. 11) und nimmt in der Konzentrationsreihe aller Produkte das Mittelmaß ein (Abb. 35). Bei der Haltbarmilch von S-BUDGET wurde am meisten CML detektiert, dicht gefolgt von der Kakaomilch von Siggi. Nach der Kaffeemilch reihen sich weiter die laktosefreie Buttermilch von SPAR und schließlich die Vollmilch von Stainzer ein.

Somit ist es vorerst gelungen, in jedem Produkt N^c-Carboxymethyllysin erfolgreich zu detektieren. *Drusch et al. (1999)* gelangen es beispielsweise nicht, CML in pasteurisierter oder ultrahocherhitzter Milch zu detektieren. Womöglich wurde die UHT-Behandlung zu kurz bzw. zu schnell durchgeführt, sodass angeblich noch nicht genug Zeit für die Synthese einer detektierbaren Menge von CML vorhanden war, für welche eine ausreichende Dauer sowie hohe Temperaturen Voraussetzung sind. Bei 1 aus 13 sterilisierten Proben, wobei der Erhitzungsvorgang sich über 20 – 40 min erstreckte, wurde CML detektiert. *Hewedy et al. (1994)* wiederum konnte ebenso bei Hitzebehandlungen von 148 °C für 128 s CML detektieren.

Vergleiche zu dessen ermittelten Ergebnissen mit jenen von dieser Arbeit stellten schnell klar, dass hierbei jedoch Unterschiede im Ausmaß einer Zehnerpotenz vorlagen. Es konnten vorrangig Korrelationen zur AGE-Datenbank von Henle (2013) (Tab. 4) festgestellt werden. Wiederum wurden hier im Gegensatz zum Ergebnis von *Drusch et al. (1999)* keine Ergebnisse von sterilisierten Milchproben gefunden.

Die erhaltene Menge im pasteurisierten Vollmilchprodukt liegt beispielsweise im Bereich der in der AGE-Datenbank angegebenen Werte, sowie jene der Kakaomilch, welche hier der aromatisierten Milch untergeordnet wurde. Diese entspricht einem Wert von bis zu 41,3 mg CML/100 g Protein. Der erhaltene Wert der laktosefreien Milch entspricht nahezu exakt dem der Datenbank, während die UHT-behandelte Haltbarmilch dessen vergleichenden Wert knapp überschreitet.

Die ermittelten Werte der Kondensmilch liegen jedoch weit unter den bekannten Ergebnissen. In dieser Arbeit befinden sich alle ermittelten Konzentrationen in nahezu einem Bereich, wobei kondensierte Milch um ungefähr das Zehnfache mehr CML beinhalten sollte. Warum diese Menge jedoch in diesem Produkt nicht erreicht wurde, verbleibt vorerst unklar.

Vergleicht man die Behandlungsarten miteinander (Tab. 3), lassen sich Korrelationen hinsichtlich der Werte der zugehörigen Produkte veranschaulichen. Pasteurisierung ist ein Verfahren, das bei vergleichbar niedrigen Temperaturen von 72 – 75 °C über maximal eine halbe Minute lang andauert. Dies sind sehr schwache Hitzeeinwirkungen, bei welcher die Synthese von CML keine optimalen Bedingungen findet. Die Ultraheizerhitzung wird bei weitaus höheren Temperaturen (135 – 150 °C) durchgeführt, jedoch bei einer maximalen Dauer von 8 s wiederum wenig Zeit für Bildung von Maillard-Produkten sowie anderen Wegen zur CML- Synthese bietet.

Die Vollmilch von Stainzer sowie die laktosefreie Buttermilch von SPAR entsprechen der Behandlung einer Pasteurisation. Die Buttermilch wies nahezu gleich viel an detektiertem CML auf, obwohl sie frei von Laktose, welche als Reaktant in der frühen Phase der Maillard-Reaktion zur Bildung des Amadori-Produktes dient, war (< 0,01 g/100 ml). Als Zuckerersatz wird hier meistens Glukose verwendet; Glukose gilt als reaktivere Komponente verglichen zur Laktose. Bezüglich Kohlenhydratersatz in Milch wurde herausgefunden, dass in Gegenwart von Glukose und vollständigem Ersatz von Laktose durch Maltodextrin die höchstmögliche Wahrscheinlichkeit von blockiertem Lysin (32 % des gesamten Lysingehaltes) festgestellt wurde [Evangelisti et al., 1994], was auch die biologische Wertigkeit des Produktes sinken lässt.

Auch die Kakaomilch von Siggie enthält Zucker sowie Traubenzucker, womit sie vermutlich vor dem Erhitzungsprozess bereits vermengt wurden. Dies lässt auch auf die eher hohe Konzentration an CML schließen, da das Produkt rein aus ultraheizerhitzter Milch besteht. Zusätzlich wurde auch beschrieben, dass bereits ab dem Prozess der Kakaoaufbereitung (Trocknung und Röstung)

Amadori-Komponenten Erscheinung finden [Heinzler und Eichner, 1991] und somit die CML-Synthese entgegenwirkt. Dieses Produkt beinhaltet laut Hersteller aus 1,5 % fettarmen Kakao. Warum jedoch die Haltbarmilch von S-BUDGET die höchste Konzentration an detektierten CML aufwies, blieb fraglich. Diese wurde laut Hersteller ausschließlich ultrahochoerhitzt. Weiters wurden auch wie bereits erwähnt bei der Kaffeemilch von SPAR nicht die erwarteten Ergebnisse erzielt. Laut Hersteller wurde dieses Produkt aus ungezuckerter, kondensierter Vollmilch hergestellt und besteht aus 17,5 % aus fettfreier Milchtrockenmasse. Die Kondensmilch wird grundsätzlich aus Milch durch Eindampfen hergestellt, wobei zunächst zur Keimabtötung und Abscheiden von Albumin auf 82 – 88 °C erhitzt wird [Baltes et al., 2011]. Vielleicht könnten auch die eher niedrigen Temperaturen bei diesem Schritt die übermäßige Bildung von CML beeinträchtigen. Die zusätzlichen Angaben des Herstellers die besagen, dass diese Milch sowohl auch sterilisiert wurde, widersprechen dem wiederum; die Hitzebehandlung der Sterilisation wird vorwiegend bei 110 – 115 °C für 20 – 50 min durchgeführt (Tab. 3, Kapitel 1.2), was durch ihre große und längere Hitzeeinwirkung eigentlich gute Verhältnisse zur CML-Synthese bieten. In diesem Fall wurde jedoch wiederum festgestellt, dass sterilisierte Produkte unterschiedliche Ergebnisse vergleichen ließ. *Drusch et al. (1999)* gelang es, aus 1 von 13 sterilisierten Proben eine Konzentration an CML ermitteln zu können, während die AGE-Datenbank von *Henle (2013)* unter dem Prozess Sterilisation erst gar keine Konzentrationsangabe an CML anführt. Vielleicht sind dies schon zu extreme Bedingungen, vor allem die vergleichsweise lange Dauer der Hitzeeinwirkung, was der CML-Bildung womöglich bereits entgegenwirken könnte. Weiters gibt die AGE-Datenbank von *Henle (2013)* bei Milchpulver einen Gehalt von bis zu 23,1 mg/100 g Protein an, welches soeben in der Kaffeemilch enthalten ist, was aber ebenso eine höhere Konzentration als der erhaltene Wert darstellt. Unter Umständen könnten hier auch die Folgen der Verluste von CML im Laufe der Säurehydrolyse größere Ausmaße genommen haben. Auf diese Weise betrachtet wäre es ebenso möglich, dass umso mehr CML in den Produkten enthalten ist, desto größer auch der Verlust von jenem durch die Hydrolyse sein könnte.

Schließlich kamen auch anderweitige Unklarheiten im Laufe der Arbeit auf. Beispielsweise sorgte die unwillkürliche Verfärbung der exakt gleich behandelten Proben nach erfolgter Säurehydrolyse für Verwirrung, wie bereits in Kapitel 2.1.3.3 erwähnt. Hierbei wurden auch mehr unlösliche Partikel beim Lösen der Probe festgestellt.

Am Beispiel der hydrolysierten Vollmilchproben (Abb. 10) wurde festgehalten, in welcher Reihenfolge die Vermessungen der Probanden durchgeführt wurden, um auch auf eventuell vorkommende Unterschiede in den resultierenden Chromatogrammen schließen zu können. Es wurde sichtbar, dass tatsächlich die gelb verfärbte Probe, welche hier als erstes gemessen wurde (blau, Abb. 36), sich ab Minute 15 von den anderen beiden unterschied. Kleinere Shifts der Retentionszeiten sowie anders aussehende Peaks kamen zum Vorschein. Es war dennoch unklar, da es sich um einen nicht identifizierten Peak handelte, der hier plötzlich wesentlich höher zum Vorschein kam. Vergleiche mit den anderen Chromatogrammen stellten fest, dass jener Peak kurz vor Minute 17 beispielsweise ebenso in den der Haltbarmilch in allen drei Bestimmungen in solch einer Größe vorhanden war (Abb. 27). Vermutlich handelte es sich demzufolge lediglich um ein anderes Derivat, das ebenfalls mittels Dansylchlorid eine Verbindung eingegangen und folglich mit dieser Methode in Milch detektiert wurde. Somit verblieb die Ursache auf willkürliche Gelbverfärbung der Proben nach dem Hydrolysevorgang unklar.

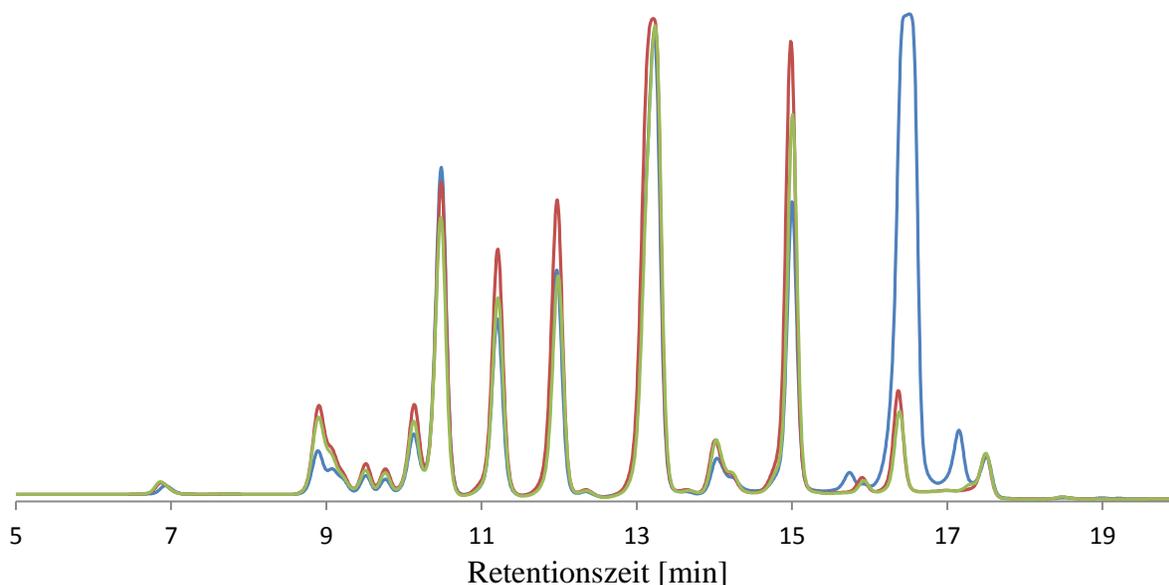


Abb. 36: Übereinandergelegte Chromatogramme der Vollmilch-Dreifachbestimmung

4 Schlussbetrachtung

Rückblickend ist zu sagen, dass der große Aufwand, den hauptsächlich die Optimierung bis hin zu einer passenden Methode einnahm, über manch Hindernisse letztendlich doch zu brauchbaren und auch zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Festzustellen war, dass dieses gesamte Verfahren nicht einfach zu handhaben war und die Analyse von N^ε-Carboxymethyllysin in Milch und Milcherzeugnissen komplex ist und somit unterschiedliche Ergebnisse aufweist, was wiederum grundsätzlich zu breitgefächerten Konzentrationsbereichen führt, wie die behandelten Quellen aufzeigten.

Es ist auch anzumerken, dass von Hersteller zu Hersteller auch unterschiedliche Methoden sowie Aufbereitungsverfahren eingesetzt werden, woraus auch folglich die Inhaltsstoffe in den daraus resultierenden Produkten variieren können. Aus den unterschiedlichen Quellen kam auch hervor, dass die Parameter für die unterschiedliche Hitzebehandlung der Milch individuell etwas abgeändert werden können.

Die „Hürde“ der Säurehydrolyse stellte sich als ein etwas schwerwiegendes Problem dar, da diese großteils willkürlichen Verluste die Aussagekraft der ermittelten Werte dementsprechend beeinträchtigen ließ. Aufgrund dessen können diese Ergebnisse womöglich eher als eine Art Annahme bezogen auf die Hitzebehandlung sowie schließlich den Produkten selbst gesehen werden.

Letztlich ist jedoch zu erwähnen, dass in allen behandelten Produkten erfolgreich N^ε-Carboxymethyllysin isoliert werden konnte. Jede Art von Hitzeeinwirkung wurde analysiert und konnte rückbetrachtend auf die jeweilige Behandlung verglichen und diskutiert werden.

5 Literaturverzeichnis

Abboud K. (2008). Caramelisierung/Maillard-Reaktion - nichtenzymatische Bräunung. *TU Berlin*. from <http://www.lmc.tu-berlin.de/?id=39645>. Letzter Zugriff: 26.03.2014

Ahmed M. U., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1986). Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of Fruktoselysine in glycated protein. *Journal of Biological Chemistry* **261** (11): 4889-4894.

Allenmark S., Bomgren B., Borén H. (1983). Direct liquid chromatographic separation of enantiomers on immobilized protein stationary phases : III. Optical resolution of a series of N-aroyl d,l-amino acids by high-performance liquid chromatography on bovine serum albumin covalently bound to silica. *Journal of Chromatography A* **264** (0): 63-68.

Anderson M. M., Requena J. R., Crowley Jan R., Thorpe Suzanne R., Heinecke Jay W. (1999). The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nε-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *The Journal of Clinical Investigation* **104** (1): 103-113.

Anlı R. E., Vural N., Yılmaz S., Vural Y. H. (2004). The determination of biogenicamines in Turkish red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**: 53-62.

Baltes W., Matissek R. (2011). *Lebensmittelchemie. Springer* **7**: 613p.

Basta G., Schmidt A. M., De Caterina R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular Research* **63** (4): 582-592.

Beljaars P. R., Van Dijk R., Jonker K. M., Schout L. J. (1998). Liquid chromatographic determination of histamine in fish, sauerkraut, and wine: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* **81** (5): 991-998.

Bierhaus A., Hofmann M. A., Ziegler R., Nawroth Peter P. (1998). AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular Research* **37** (3): 586-600.

Birlouez-Aragon I., Nicolas M., Metais A., Marchond N., Grenier J., Calvo D. (1998). A Rapid Fluorimetric Method to Estimate the Heat Treatment of Liquid Milk. *International Dairy Journal* **8** (9): 771-777.

Birlouez-Aragon I., Pischetsrieder M., Leclere J., Morales F. J., Hasenkopf K., Kientsch-Engel R., Ducauze C. J., Rutledge D. (2004). Assessment of protein glycation markers in infant formulas. *Food Chemistry* **87**: 253-259.

van Boekel M. A. J. S. (1998). Effect of heating on Maillard reactions in milk. *Food Chemistry* **62** (4): 403-414.

Busch M., Franke S., Müller A., Wolf M., Gerth J., Ott U., Niwa T., Stein G. (2004). Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney International* **66**: 338-347.

Carpenter K. J. (1960). The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem. J.* **77**: 604-600.

Charissou A., Ait-Ameur L., Birlouez-Aragon I. (2007). Evaluation of a gas chromatography/mass spectrometry method for the quantification of carboxymethyllysine in food samples. *Journal of Chromatography A* **1140** (189-194).

Chevalier F., Chobert J.-M., Genot C., Haertlé T. (2001). Scavenging of Free Radicals, Antimicrobial, and Cytotoxic Activities of the Maillard Reaction Products of β -Lactoglobulin Glycated with Several Sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (10): 5031-5038.

Danehy J. P. (1986). Maillard reactions: nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavor. *Advances in Food Research* **30**: 77-138.

Douša M. (2004). Bestimmung von Aminosäuren in Futter. *Sweb.cz*. from <http://hplc1.sweb.cz/Amk/amk.htm>. Letzter Zugriff: 26.03.2014

Drusch S., Faist V., Erbersdobler H. F. (1999). Determination of NE-carboxymethyllysine in milk products by a modified reversed-phase HPLC method. *Food Chemistry* **65**: 547-553.

Dunn J. A., Ahmed M. U., Murtiashaw M. H., Richardson J. M., Walla M. D., Thorpe S. R., Baynes J. W. (1990). Reaction of ascorbate with lysine and protein under autoxidizing conditions: formation of N.epsilon.-(carboxymethyl)lysine by reaction between lysine and products of autoxidation of ascorbate. *Biochemistry* **29** (49): 10964-10970.

Einarsson H., Snygg B. G., Eriksson C. (1983). Inhibition of bacterial growth by Maillard reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **31** (5): 1043-1047.

Erbersdobler H. F., Hupe A. (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **30** (1): 46-49.

Evangelisti F., Calcagno C., Zunin P. (1994). Relationship Between Blocked Lysine and Carbohydrate Composition of Infant Formulas. *Journal of Food Science* **59** (2): 335-337.

Faist V., Drusch S., Kiesner C., Elmadfa I., Erbersdobler H. F. (2000). Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. *International Dairy Journal* **10** (5-6): 339-346.

Farrell Jr H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* **87** (6): 1641-1674.

Fenaille F., Parisod V., Visani P., Populaire S., Tabet J.-C., Guy P. A. (2006). Modifications of milk constituents during processing: A preliminary benchmarking study. *International Dairy Journal* **16**: 728-739.

Ferreira A. E. N., Ponces Freire A. M. J., Voit E. O. (2003). A quantitative model of the generation of N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in the Maillard reaction between collagen and Glukose. *Biochem. J.* **376** (1): 109-121.

Finot P. A., Viani R., Bricout J., Mauron J. (1969). Detection and identification of pyridosine, a second lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk. *Experientia* **25** (2): 134-135.

Frattini V., Lionetti C. (1998). Histamine and histidine determination in tuna fish samples using high-performance liquid chromatography: Derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection or UV detection of "free" species. *Journal of Chromatography A* **809** (1-2): 241-245.

Fu Min-Xin., Requena J. R., Jenkins A. J., Lyons T. J., Baynes J. W., Thorpe S. R. (1996). The Advanced Glycation End Product, N-(Carboxymethyl)lysine, Is a Product of both Lipid Peroxidation and Glycoxidation Reactions. *Journal of Biological Chemistry* **271** (17): 9982-9986.

Glomb M. A., Monnier V. M. (1995). Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *Journal of Biological Chemistry* **270** (17): 10017-10026.

Han Y., Randell E., Vasdev S., Gill V., Gadag V., Newhook L.-A., Grant M., Hagerty D. (2007). Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Molecular and Cellular Biochemistry* **305** (1-2): 123-131.

Hartkopf J., Pahlke C., Liidemann G., Erbersdobler H. F. (1994). Determination of Nε-carboxymethyllysine by a reversed-phase high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatography A* **672**: 242-246.

Haug A., Høstmark A. T., Harstad O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease* **6** (1): 1-16.

Hayashi T., Namiki M. (1980). Formation of two-carbon sugar fragment at an early stage of the browning reaction of sugar with amine. *Agricultural and Biological Chemistry* **44** (11): 2575-2580.

Heinzler M., Eichner K. (1991). Verhalten von Amadori-Verbindungen während der Kakaoverarbeitung. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **192** (1): 24-29.

Heiss R. (2004). Lebensmitteltechnologie: Biotechnologische, chemische, mechanische und thermische Verfahren der Lebensmittelverarbeitung. *Springer* **6**.

Henle T. (2013). Overview milk products. *AGE Datenbank, TU Dresden*. from http://tu-dresden.de/die_tu_dresden/fakultaeten/fakultaet_mathematik_und_naturwissenschaften/fachrichtung_chemie/lc/forschung/age_data/overview_milk/index_html. Letzter Zugriff: 26.03.2014

Henle T., Schwarzenbolz U., Klostermeyer H. (1996). Irreversible crosslinking of casein during storage of UHT-treated milk. *Heat Treatments and Alternative Methods* (9602): 290-298.

Hewedy M. M., Kiesner C., Meissner K., Hartkopf J., Erbersdobler H. F. (1994). Effects of UHT heating of milk in an experimental plant on several indicators of heat treatment. *Journal of Dairy Research* **61** (02): 305-309.

Ilisz I., Aranyi A., Pataj Z., Péter A. (2012). Enantiomeric separation of nonproteinogenic amino acids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1269** (0): 94-121.

Keweloh H. (2006). Mikroorganismen in Lebensmittel - Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene. *Pfanneberg* **1**: 367p.

Kislinger T., Fu C., Huber B., Qu W., Taguchi A., Du Yan S., Hofmann M., Yan S. F., Pischetsrieder M., Stern D., Schmidt A. M. (1999). Nε-(Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* **274** (44): 31740-31749.

Liu H. C., Chen W. L., Mao S. J. T. (2007). Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science* **90** (2): 547-555.

Liu F., Gao F., Tang T., Sun Y., Li T., Zhang W. (2013). Analysis of amines in water samples by high performance liquid chromatography-laser induced fluorescence detection. *Se Pu (=Chinese Journal of Chromatography / Zhongguo hua xue hui)*. **31** (11): 1112-1115.

Mafra I., Herbert P., Santos L., Barros P., Alves A. (1999). Evaluation of biogenic amines in some Portuguese quality wines by HPLC fluorescence detection of OPA derivatives. *American Journal of Enology and Viticulture* **50** (1): 128-132.

Martins S. I. F. S., Jongen W. M. F. and van Boekel M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology* **11**: 364-373.

Mauron J. (1990). Influence of processing on protein quality. *Journal of nutritional science and vitaminology* **36** (1): 57-69.

Mikulle D. (2003). Prof. Bulmes Bildungsserver für Chemie. Cornelsen Verlag. from http://bbsinfo.bb.ohost.de/fg12_2/46/Materialien/ERN/Prof%20Blume/milch/dc2.uni-bielefeld.de/dc2/milch/micellen.htm. Letzter Zugriff: 26.03.2014

Molins-Legua C., Campíns-Falcó P., Sevillano-Cabeza A. (1998). Automated pre-column derivatization of amines in biological samples with dansyl chloride and with or without post-column chemiluminescence formation by using TCPO-H₂O₂. *The Analyst* **123** (12): 2871-2876.

Moravčík J., Hroboňová K. (2014). Separation of amino acid enantiomers by high performance liquid chromatography. *Ceska Slov Farm.* **63** (1): 4-12.

Moret S., Cherubin S., Rodriguez-Estrada M. T., Lercker G. (1994). Determination of lysinoalanine by high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* **17** (12): 827-830.

Moret S., Conte L. S. (1996). High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods an analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A* **729** (1-2): 363-369.

Münch G., Thome J., Foley P., Schinzel R., Riederer P. (1997). Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews* **23** (1-2): 134-143.

Nagai R., Ikeda K., Kawasaki Y., Sano H., Yoshida M., Araki T., Ueda S., Horiuchi S. (1988). Conversion of Amadori product of Maillard reaction to N ϵ -(carboxymethyl)lysine in alkaline condition. *FEBS Letters* **425**: 355-360.

Nagai R., Ikeda K., Higashi T., Sano H., Jinnouchi Y., Araki T., Horiuchi S. (1997). Hydroxyl Radical Mediates N ϵ -(Carboxymethyl)lysine Formation from Amadori Product. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **234** (1): 167-172.

Nagai R., Unno Y., Hayashi M. C., Masuda S., Hayase F., Kinae N., Horiuchi S. (2002). Peroxynitrite Induces Formation of N ϵ -(Carboxymethyl)Lysine by the Cleavage of Amadori Product and Generation of Glucosone and Glyoxal From Glukose: Novel Pathways for Protein Modification by Peroxynitrite. *Diabetes* **51** (9): 2833-2839.

Namiki M. (1988). Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Advances in Food Research* **32**: 115-184.

O'Brien J., Morrissey P. A. (1997). Metal ion complexation by products of the Maillard reaction. *Food Chemistry* **58** (1-2): 17-27.

Péter A., Péter M., Fülöp F., Török G., Tóth G., Tourwé D., Sápi J. (2000). High-performance liquid chromatographic separation of unusual amino acid enantiomers derivatized with (1S,2S)-1,3-diacetoxy-1-(4-nitrophenyl)-2-propyl-isothiocyanate. *Chromatographia* **51** (1): 148-154.

Resmini P., Pellegrino L., Battelli G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by direct HPLC method. *Italian journal of food science* **1990** (2): 173 - 184.

Rolls B. A., Porter J. W. G. (1973). Some effects of processing and storage on the nutritive value of milk and milk products. *Proceedings of the Nutrition Society* **32** (1): 9-15.

Romero R., Gázquez D., Bagur M. G., Sánchez-Viñas M. (2000). Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **871** (1-2): 75-83.

Salzer R., Dr. Thiele S., Dr. Zuern A., Zimmerer C., Bezugla E., Schleicher K. (2013). Chemgaroo. *ChemgaPedia*. from <http://www.chemgapedia.de>. Letzter Zugriff: 27.03.2014

Sanchez L. (2001). TCA protein precipitation protocol. from http://www.its.caltech.edu/~bjorker/Protocols/TCA_ppt_protocol.pdf. Letzter Zugriff: 26.03.2014

Schleicher E. D., Wagner E., Nerlich A. G. (1997). Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *The Journal of Clinical Investigation* **99** (3): 457-468.

Schwedler S. B., Metzger T., Schinzel R. and Wanner C. (2002). Advanced glycation end products and mortality in hemodialysis patients. *Kidney International* **62**: 301-310.

Shahani K. M., Harper W. J., Jensen R. G., Parry Jr R. M., Zittle C. A. (1973). Enzymes in Bovine Milk: A Review. *Journal of Dairy Science* **56** (5): 531-543.

Singh R., Barden A., Mori T., and Beilin L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologica* **44** (2): 129-146.

Spanyár P., Kevei P. (1963). Über die Stabilisierung von Vitamin C in Lebensmitteln. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **120** (1): 1-17.

Tanji N., Markowitz G. S., Fu C., Kislinger T., Taguchi A., Pischetsrieder M., Stefan D., Schmidt A. M., D'agati V. D. (2000). Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **11** (9): 1656-1666.

Thornton D. J., Dr. Apweiler R., Birney E. (2014). European Molecular Biology Laboratory. from <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI%3A53014>. Letzter Zugriff: 27.03.2014

van de Kerkhof J., Schalkwijk C. G., Konings C. J., Cheriex E. C., van der Sande F. M., Scheffer P. G., ter Wee P. M., Leunissen K. M., Kooman J. P. (2004). N^ε-(carboxymethyl)lysine, N^ε-(carboxyethyl)lysine and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in relation to peritoneal Glukose prescription and residual renal function; a study in peritoneal dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* **19** (4): 910-916.

Weiss M. F., Erhard P., Kader-Attia F. A., Wu Y. C., Deoreo P. B., Araki A., Glomb M. A., Monnier V. M. (2000). Mechanisms for the formation of glycoxidation products in end-stage renal disease. *Kidney International* **57** (6): 2571-2581.

Wells-Knecht K. J., Zyzak D. V., Litchfield J. E., Thorpe S. R. and Baynes J. W. (1995). Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by Glukose. *Biochemistry* **34** (11): 3702-3709.

Winzenried H. U. (1955). Die Wirkung von Umwelt- und Erbfaktoren auf die Zusammensetzung der Milch mit besonderer Berücksichtigung des Milchfettes und seiner Bestandteile. *Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* **64** (2): 105-152.

Wood-Rethwill J. C., Warthesen J. J. (1980). Lysinoalanine determination in proteins using high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science* **45** (6): 1637-1640.

Zabbia A., Buys E. M., De Kock H. L. (2012). Undesirable Sulphur and Carbonyl Flavor Compounds in UHT Milk: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **52** (1): 21-31.