



Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in  
Lebensmitteln und im Serum exponierter Mäuse -  
Eine Basis für die Abschätzung der alimentären  
Exposition und Bioverfügbarkeit

---

**Masterarbeit**

**Evelina Dimitrova**

2013

Institut für Biochemie der TU Graz

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

---

# Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Michael Murkovic für die fachlichen Ratschläge, für die Hilfe und moralische Unterstützung, sowie für die Korrektur meiner Masterarbeit bedanken.

Weiters möchte ich Frau Camilla Svendsen und Frau Trine Husøy, National Institute of Public Health, Oslo/Norwegen, für die zur Verfügung gestellten Proben danken.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen LaborkollegInnen für die freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor.

Schließlich danke ich meinen Eltern für das Verständnis, die moralische Unterstützung und für alles Weitere!

# Zusammenfassung

Glyoxal und Methylglyoxal sind Dicarbonylverbindungen, die oft als Nebenprodukte von Stoffwechselfvorgängen entstehen. Sie werden im Rahmen der Maillard-Reaktion gebildet, können aber auch durch Glykolyse, bei der Autoxidation von Hexosen (*Wells-Knecht et al., 1995*) oder aus dem Abbau von Fettsäuren (*Glomb und Lang, 1997; Weenen, 1998*) gebildet werden. Sie sind physiologische Substrate für das Enzym Glyoxalase 1.

Glyoxal und Methylglyoxal entstehen als sehr reaktive Zwischenstufen des Zuckerabbaus und sind in der Lage, mit freien Aminogruppen von Proteinen zu reagieren und somit die Proteinstruktur verändern. Aufgrund der hohen Reaktivität dieser Zuckerabbauprodukte kann man keinen hohen Gehalt in Lebensmitteln erwarten.

Die beiden Produkte zeigen in Modell- und Tierversuchen antibakterielle und cytotoxische Effekte. Die mutagene und karzinogene Wirkung des Methylglyoxals wurde in verschiedenen Experimenten mit Labortieren nachgewiesen.

Die Methode zur Quantifizierung der beiden Dicarbonylverbindungen in dieser Masterarbeit basiert auf einer Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin zur Bildung, wobei ein Quinoxalinderivat entsteht, welches mittels RP-HPLC analysiert wird. Als Laufmittel wird ein Gemisch aus Wasser und Methanol in Verhältnis 50:50 verwendet. Detektiert werden die beiden Substanzen mit einem UV-Detektor bei 318 nm. Die Kalibration erfolgte mit den Referenzsubstanzen Glyoxal und Methylglyoxal.

Die Proben zur Bestimmung des Gehalts von den beiden Dicarbonylverbindungen sind Lebensmittel und Blutplasma aus Mäusen, die mit Glyoxal gefüttert wurden und unterschiedliche Diät haben.

Ein hoher Gehalt an Glyoxal und Methylglyoxal wurde in für die Maillard-Reaktion typischen Lebensmittelprodukten, wie Backwaren (Kekse, Salzstangen, Knäckebröte, Chips), mit einer Konzentration an Glyoxal von bis zu 20 µg/g und von Methylglyoxal bis zu 21 µg/g für; Kaffee (bis zu 103 µg/g MGO und 12,5 µg/g Glyoxal), Käse (10,7 µg/g MGO), Kaviar (6,2 µg/g Glyoxal) nachgewiesen.

Die Blutserum-Proben lassen auf den ersten Blick keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Zusätzlich hatte die Glyoxal-Exposition nicht zu einer Erhöhung von Anzahl oder Größe der intestinalen Tumoren geführt. Dies kann man aufgrund der Tatsache erläutern, dass das Glyoxal nicht intestinal krebserzeugend ist oder es wurde schnell vom Glyoxalase-System entgiftet.

## Abstract

The glyoxal and methylglyoxal are dicarbonyl compounds, which are often formed as by-products in metabolic process. They are not only formed as a result of the Maillard reaction, but also by glycolysis, autooxidation of hexoses (*Wells-Knecht et al., 1995*) or oxidation of fatty acids (*Glomb and Lang, 1997; Weenen, 1998*). All they are physiological substrates of the glyoxalase 1 enzyme.

The glyoxal and methylglyoxal are highly reactive intermediates resulting from the degradation of carbohydrates which can react with the free amino groups from proteins. By this way they can change the protein structure. Based on the high reactivity of these products during the sugar degradation it could not be expected that a high content of these reactants in the food products might be found in foods. In experiments with animals and in model experiments the glyoxal and methylglyoxal show antibacterial and cytotoxic effects. The mutagenic and carcinogenic activity of the methylglyoxal is proven in a lot of laboratory experiments.

The method for quantification of the two dicarbonyl compounds is based on the derivatization with o-phenyldiamine and the creation of quinoxaline derivatives, which are analyzed with Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP HPLC). A mixture of methanol and water (50 %) is used as eluent and after chromatography the glyoxal and methylglyoxal are detected with a UV – detector set to 318 nm. A calibration is made with reference substances of glyoxal and methylglyoxal.

The samples with the highest concentration of the two dicarbonyl compounds are food products and blood plasma from mice, which are fed with glyoxal and have had a different diet.

High concentrations of glyoxal and methylglyoxal are found in foods that are typical for Maillard-reaction like the dough based foods (biscuits, crisp breads, chips) with a concentration of up to 20 µg/g for GO and 21 µg/g for MGO and in coffee (103 µg/g MGO and 12,5 µg/g glyoxal), cheese (10,7 µg/g MGO), caviar (6,2 µg/g glyoxal) and others.

For the mice, there were no differences between the groups for the concentration of glyoxal in the serum. The glyoxal exposure did not increase the number or size of intestinal tumours. This may be due to the fact that glyoxal is not an intestinal carcinogen or was quickly detoxified by the glyoxalase system.

# INHALTSVERZEICHNIS

	ZUSAMMENFASSUNG	3
1.	PROBLEMSTELLUNG	7
2.	EINLEITUNG	8
2.1.	MAILLARD REAKTION	8
2.2.	GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL – BILDUNG UND EIGENSCHAFTEN	12
2.3.	PHYSIOLOGISCHE FOLGEN UND TOXIZITÄT	16
2.4.	ANALYTIK	19
2.5.	GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN LEBENSMITTELN. BIOVERFÜGBARKEIT	21
2.6.	HPLC	23
3.	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1.	CHEMIKALIEN, GERÄTE UND HILFSMATERIALIEN	25
3.1.1.	CHEMIKALIEN	25
3.1.2.	GERÄTE	25
3.1.3.	HILFSMATERIALIEN	25
3.2.	METHODE ZUR BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL	26
3.2.1.	BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN LEBENSMITTEL	27
3.2.1.1.	PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE BESTIMMUNG VON 1,2 DICARBONYLVERBINDUNGEN (GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL)	27
3.2.1.2.	VALIDIERUNG DER METHODE	27
3.2.2.	BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN BLUTPLASMA	29
3.2.2.1.	PROBENVORBEREITUNG ZUR BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN BLUTSERUM	29
3.2.2.2.	VALIDIERUNG DER METHODE	30
3.2.2.3.	KALIBRATION	30
4.	ERGEBNISSE	31
4.1.	BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN	31

	LEBENSMITTEL	
4.1.1.	VALIDIERUNG	31
4.1.2.	KALIBRATION	31
4.1.3.	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN LEBENSMITTELPROBEN	33
4.1.4.	BESTIMMUNG VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN KEKSPROBEN	39
4.2.	KONZENTRATION VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN MAUSBLUTSERUM	41
4.2.1	VALIDIERUNG	41
4.2.2.	KALIBRATION	41
4.2.3.	BESTIMMUNG DER KONZENTRATION VON GLYOXAL UND METHYLGLYOXAL IN BLUTSERUM-PROBEN	46
5.	DISKUSSION	51
5.1.	LEBENSMITTEL	51
5.2.	BLUTSERUM	52
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	53
	LITERATURVERZEICHNIS	55

# 1. Problemstellung

Es soll eine schnelle, effektive und möglichst genaue Methode zur Quantifizierung des Gehalts von Glyoxal und Methylglyoxal entwickelt werden, womit dann verschiedene Lebensmittelproben und Blutserumsproben von Mäusen, denen unterschiedliche Mengen an Glyoxal oral verabreicht wurde, untersucht werden. Das Ziel der Analyse ist die Bestimmung der Exposition und der Bioverfügbarkeit der Glyoxals und Methylglyoxals in verschiedenen Typen Lebensmittel und in Blutserum.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Masterarbeit eine Methode mittels RP HPLC – Analyse und UV – Detektion angewendet. Diese HPLC – Methode wurde ausgewählt, weil eine gute Trennung der Substanzen durchgeführt wird und es aus verschiedenen Arbeitsgruppe geprüft und gut erforscht ist.

## 2. Einleitung

### 2.1. Maillard Reaktion

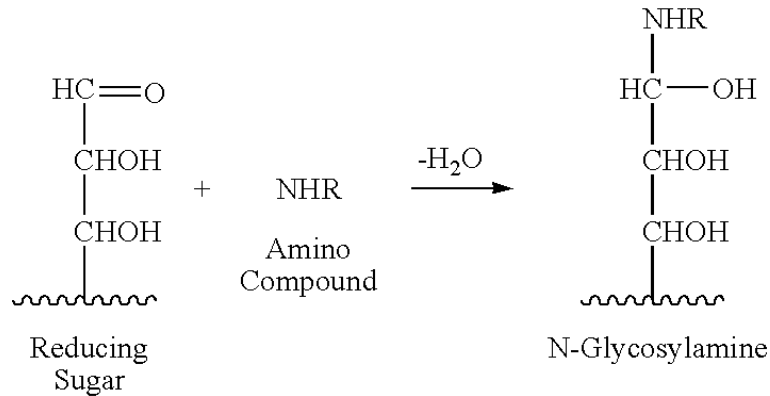
Glyoxal und Methylglyoxal werden hauptsächlich durch die Maillard Reaktion gebildet. Die Maillard Reaktion ist nach dem französischen Wissenschaftler Louis Camille Maillard benannt. Sie ist eine nicht enzymatische Bräunungsreaktion. Man unterscheidet drei Typen Bräunungsreaktionen. Die Reaktion zwischen reduzierenden Kohlenhydraten und freien oder proteingebundenen Aminosäuren ist als nichtenzymatische Bräunung (Maillard-Reaktion) bekannt. Sie hat einen zentralen Stellenwert bei Lebensmittelverarbeitungsprozessen und *in vivo*. Der zweite Typ der Bräunungsreaktionen ist die Karamellisierung, die bei dem Erhitzen von Kohlenhydraten abläuft. Zum dritten Typ, der enzymatischen Bräunung, gehören Reaktionen, die oxidativ unter Beteiligung von Sauerstoff ablaufen (*Hodge, 1953*). Beispiel dafür ist die Oxidation von Ascorbinsäure oder von Polyphenolen zu Di- oder Polycarbonylverbindungen.

Erste umfangreiche Untersuchungen dieser Reaktionen wurden bereits im Jahr 1912 von Louis-Camille Maillard (*Maillard, 1912*) durchgeführt. Er beobachtete während des Erhitzens von Glucose-Glycin-Modellansätzen die Bildung brauner Pigmente und von Kohlendioxid (*Maillard 1912*). Diese nach seinem Entdecker benannte Reaktion wird daher auch als nicht-enzymatische Bräunung bezeichnet.

Die Maillard Reaktion verläuft in drei Phasen, wobei unter der Vielzahl von Reaktionsprodukten auch Glyoxal und Methylglyoxal gebildet werden. Die erste Phase ist die Frühphase. In der Frühphase der Maillard-Reaktion kommt es zur Bildung von Amadori-Produkten ausgehend von Glucose über eine nukleophile Addition der Aminokomponente an die Carbonylfunktion (Aminogruppe von Aminosäuren, Peptiden, Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren) von Zuckern unter Bildung von Glucosyliminen (Abb. 2.1.). Es entstehen instabile Aldimine. Diese sind in der Lage, sich in die entsprechenden 1,2-Glucosylenaminole bzw. 2,3-Glucosylenaminole umzulagern. Es entstehen aus N-Glykosiden von Aldosen Amadori-Produkte und aus N-Glykosiden von Ketosen Heyns-Produkte. Die instabilen Glykosylamine aus Aldosen und Aminosäuren oder aliphatischen Aminen durchlaufen eine intramolekulare Umwandlung (Amadori-Umlagerung) und werden in die entsprechenden 1-Amino-1-desoxy-ketosen (Ketoseaminosäuren) umgewandelt (*Frandsrup-Kuhr, 2004*). Die



analoge Umlagerung von Ketosylaminen zu 2-Amino-2-desoxyaldosen wird als Heyns-Umlagerung bezeichnet (*Angrick und Rewicki, 1980*). Ausgehend von Fructose werden analog zu Amadori-Heyns-Verbindungen über ein Fructosylimin und darauffolgende Umlagerung zu 1,2-Fructosylenaminol gebildet.

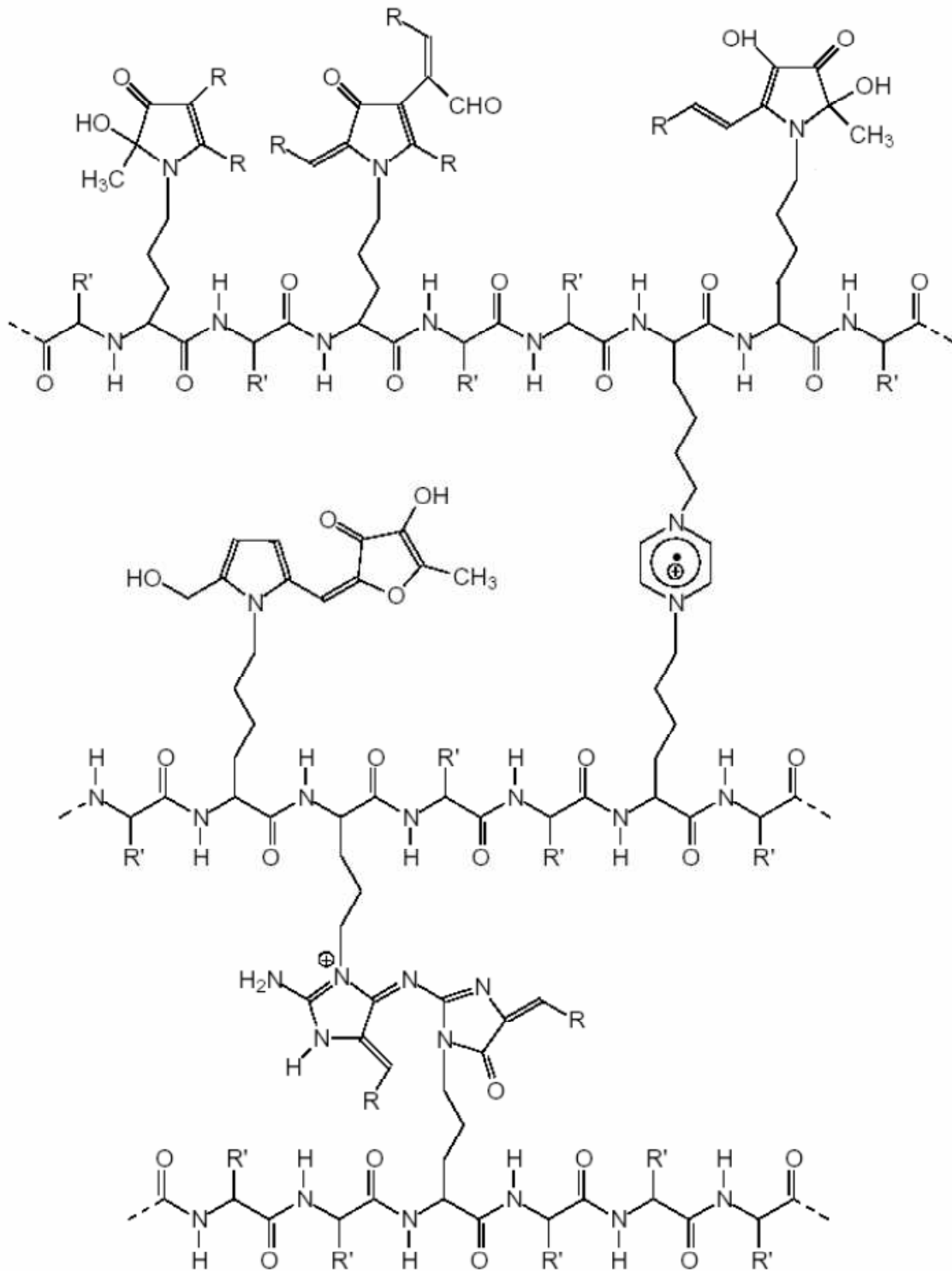


**Abbildung 2.1. Erste Phase der Maillard-Reaktion (*McCook et al. 2012*).**

In der zweiten (fortgeschrittene) Phase findet ein Abbau der Amadori- bzw. Heyns-Verbindungen auf verschiedenen Wegen zu den  $\alpha$ -Carbonylverbindungen (Desoxyosonen) stattfindet. Diese Verbindungen sind sehr reaktiv und sie besitzen stark reduzierende Eigenschaften und werden daher als Reduktone bezeichnet. Sie haben intermediären Charakter. Diese sind sehr reaktiv und können isomerisieren, cyclisieren, dehydratisieren, und sich an Redoxreaktionen beteiligen (*Frandrup-Kuhr, 2004*). Die Knüpfung von neuen Bindungen und anschließende Cyclisierung führt dabei zur Bildung einer Vielzahl von heterocyclischen Verbindungen. Sie können Lebensmittel gegen den oxidativen Verderb schützen (*Eichner, 1980*).

In der finalen Phase sind die in der fortschreitenden Phase der Maillard-Reaktion gebildeten  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen unmittelbare Vorstufen für geruchsaktive Heterocyclen und durch Polymerisation und Vernetzung dieser Verbindungen entstehen niedermolekulare Prämelanoidine und höhemolekulare Melanoidine (*Frandrup-Kuhr, 2004*) (Abb.2.2.) .

In dieser Phase laufen verschieden Fragmentierungsreaktionen ab, die zur Bildung von 1,2-Dicarbonylverbindungen, wie Glyoxal (GO), Methylglyoxal (MGO), Diacetyl, Acetaldehyd und organischen Säuren wie Essig- und Ameisensäure führen (*Hodge, 1953, Brands & van Boekel, 2001*).

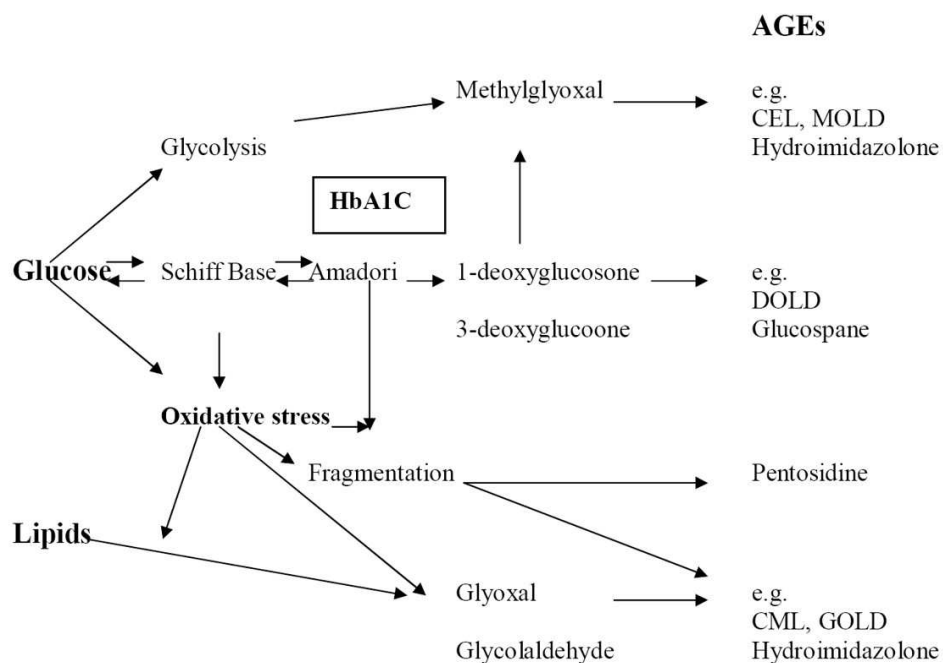


**Abbildung 2.2. Quervernetzung von Proteinen und Melanoidinbildung (Frandrup-Kuhr, 2004).**

Melanoidine sind braune Pigmente, die in durch Erhitzen hergestellten Lebensmitteln wie Brot, Kaffee, Bier enthalten sind. Die Melanoidine entstehen als Nebenprodukte bei der Maillard-Reaktion. Dabei reagiert die Carbonylgruppe der Zucker mit der Aminogruppe

der Aminosäure, wobei Stickstoff - substituierte Glycosylamine und Wasser entstehen. Die Melanoidine sind Produkte von Glycosylaminen. Eines der wenigen definierten Melanoidine ist das Pronyl-Lysin, dessen Struktur aufgeklärt wurde (*Lindenmeier et al. 2002*). Diese Stoffe spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Lebensmittelqualität – Geruch, Farbe und Geschmack. Als positiver Effekt kann die antioxidative Wirkung der Melanoidine erwähnt werden. Eine der negativen Wirkungen ist die reduzierte Aufnahme von Spurenelementen, die damit dem Organismus entzogen werden.

Manche Produkte der Maillard-Reaktion wirken als Antioxidanten und sie verlängern die Haltbarkeit von Lebensmitteln, indem sie Sauerstoff-Radikale abfangen. Sie können auch als Indikator genutzt werden. Viele Maillard-Produkte, die unter extremen Bedingungen entstehen, haben toxische Wirkung oder sie können krebserregend sein, wie z.B. Acrylamid und das im Metabolismus gebildete Epoxid Glycidamid. Typische Beispiele für die Maillard-Reaktion sind die bei dem Erhitzen entstehenden Aromastoffe von gebratenen, gerösteten und gebackenen Lebensmittel, wie Kaffee, Brot, Karamel, Fleisch, Bier und andere.



**Abbildung. 2.3. Produkte der Maillard-Reaktion und Bildung des AGEs *in vivo*. CEL - carboxyethyllysine; MOLD - methylglyoxal lysine dimer; DOLD - 3-deoxyglucosone lysine dimer; CML - carboxymethyllysine; GOLD, glyoxal lysine dimer (*Meerwaldt et al., 2008*).**

## 2.2. Glyoxal und Methylglyoxal – Bildung und Eigenschaften

Glyoxal (Ethandial) gehört zu den chemischen Verbindungen der Dialdehyde und wird normalerweise als 40%-ige wässrige Lösung gehandelt. Im Labor kann Glyoxal durch Oxidation von Acetaldehyd mit Salpetersäure (Ronzio und Waugh, 1944) und Abfangen des Glyoxals als Natriumhydrogensulfit-Addukt darstellen. Glyoxal wird durch Maillard-Reaktion, auch in Lipidperoxidation durch oxidativen Abbau von Glucose und glykierte Produkte gebildet (Zardari et al. 2009).

*Glyoxal bildet beim Erhitzen riechende grüne Dämpfe, die in der Kälte zu gelben prismatischen Kristallen vom Schmelzpunkt 15 °C kondensieren. Es polymerisiert leicht zu farblosem Polyglyoxal. Glyoxal hat eine gute Löslichkeit in Wasser. In wässriger Lösung liegt Glyoxal als Dihydrat vor, das isolieren kann. Glyoxal ist als wässrige Lösung mit 40 % und als trimeres, festes Hydrat ( $3 \text{ C}_2\text{H}_2\text{O}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ; Dampfdruck bei 26 °C: 378 hPa) kommerziell erhältlich. Bei Einwirkung von wässriger Alkalilauge geht Glyoxal durch intramolekulare Cannizzaro-Reaktion in das Salz der Glycolsäure über.<sup>1</sup>*

Methylglyoxal, auch Pyruvaldehyd oder 2-Oxopropanal ist die Aldehyd-Form von Brenztraubensäure. Es hat zwei Carbonylgruppen, so ist es eine Dicarbonylverbindung.

In Organismen wird Methylglyoxal als Nebenprodukt verschiedener Stoffwechselwege gebildet (Inoue und Kimura, 1995). Es kann aus 3-Aminoaceton, welches ein Zwischenprodukt des Threonin-Katabolismus ist, sowie durch Lipidperoxidation gebildet werden. In der Glykolyse entsteht Methylglyoxal durch enzymatische Phosphat-Eliminierung aus Glycerinaldehydphosphat und Dihydroxyacetonphosphat – zwei Zwischenprodukte der Glykolyse. Das Methylglyoxal ist hoch cytotoxisch, entwickelt der Körper mehrere Detoxifikationsmechanismen. Eines davon ist die Glyoxalase System. Methylglyoxal reagiert mit Glutathion und wird ein Hemithioacetal gebildet. Dies wird in S-D-lactoyl-Glutathion durch Glyoxalase I, (Thornalley, 2003) und dann es weiter in D-Lactat durch Glyoxalase II umwandelt (Van der Jagd, 2003).

Warum Methylglyoxal im Metabolismus hergestellt wird, bleibt unbekannt, aber die Forschung zeigt, dass es bei der Bildung von fortgeschrittenen Glykosilierungsendprodukten beteiligen sein kann (AGEs). In diesem Prozess reagiert Methylglyoxal mit den freien Aminogruppen von Lysin und Arginin und mit Thiolgruppen von Cystein; als Endprodukt entstehen AGEs (Advanced Glycation Endprodukts).

---

<sup>1</sup> <http://de.wikipedia.org/wiki/Glyoxal>

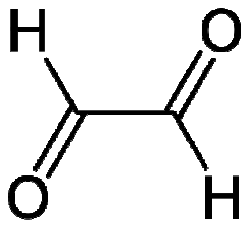


Abbildung 2.4. Glyoxal

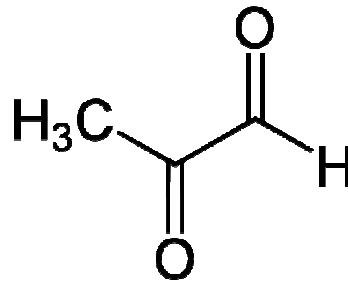


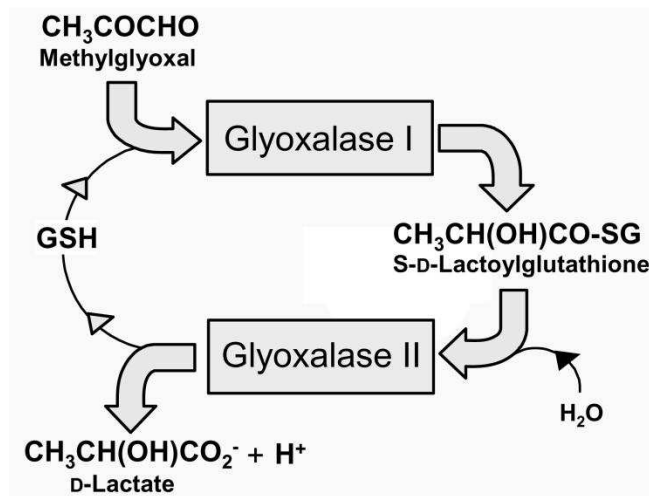
Abbildung 2.5. Methylglyoxal

Methylglyoxal (2-Oxopropanal, MGO) ist im gesamten menschlichen Körper enthalten. Obwohl es bei niedrigen Konzentrationen harmlos ist, kann das Methylglyoxal toxisch sein, wenn die seine Konzentration über dieser des SH-Glutathion ist, oder etwa 1 mM (*Szent-Gyorgyi, 1977*). Methylglyoxal wurde auch als ein wichtiger Metabolit in der zellulären und extrazellulären Herstellung von Advanced Glycation Endprodukts (AGE) identifiziert, die in weiterer Folge auch eine Rolle bei Hyperglykämie und Diabetes spielen. Neuere Studien haben gezeigt, dass MGO ein natürlich vorkommendes Zwischenprodukt in einer Nebenreaktion der Glycolyse ist. Insbesondere wird die Bildung von MGO von der nicht-enzymatische oder enzymatischen Abspaltung von Phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat für die Hauptquelle von MGO im Körper angenommen (*McLellan, 1992*). Aber ist die Biosynthese des MGO in Tieren kompliziert und sehr umstritten (*Ohmori et al. 1989*). Die laufende Debatte hat ihre Ursache darin, dass die Konzentration des MGO in biologischen Geweben bisher nicht zweifelsfrei bestimmt werden konnte. Aufgenommenes MGO wird schnell abgebaut, was aber nicht durch eine erhöhte Exposition ausgeglichen werden kann, da diese Substanz ab einer bestimmten Menge toxisch wird (*Szent-Gyorgyi, 1977; Dwyer und Fillo, 2006*).

Die Glykosylierung von Proteinen kann in Verbindung zu verschiedenen Krankheiten gebracht werden. Insbesondere die Entwicklung von chronischen klinischen Komplikationen im Zusammenhang mit Diabetes mellitus - Retinopathie, Neuropathie und Nephropathie, nicht-diabetischer Nephropathie, macrovasculäre Krankheit, Alzheimer-Krankheit, Katarakt, Alterung (*Thornalley et al.1999*).

Die Modifizierung von Proteinen, Nukleotiden und grundlegender Phospholipide mit Glyoxal und Methylglyoxal ist potenziell schädlich für die Proteom, Genom und Lipidom. GO und MGO sind physiologische Substrate für das Glyoxalase System (Abb. 2.6.) Glyoxalase 1

unterdrückt die Glykosylierung von diesen  $\alpha$ -Oxoaldehyd Metaboliten und stellt damit einen Teil der Verteidigung gegen enzymatische Glykosylierung dar (Thornalley, 2008).



**Abbildung. 2.6. Das Glyoxalase-System und Metabolismus von Methylglyoxal (Thornalley, 2008).**

Die Glyoxal und Methylglyoxal können mit Proteinen sehr schnell und leicht reagieren und zur Bildung von AGE-Resten führen. Wichtige AGE sind die Hydroimidazolen, die bei der Modifizierung von Arginin-Resten mit Glyoxal und abgeleitet werden. So entstehen verschiedene Produkte wie  $N_\delta$ -(5-hydro-4-imidazol-2-yl)ornithine (G-H1) und  $N_\delta$ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithine (MG-H1). Es gibt gleichzeitig eine Bildung von Addukten abgeleitet aus Lysin, wie  $N_\epsilon$ -carboxymethyl-Lysin (CML) und  $N_\epsilon$ -Carboxyethyl-Lysin (CEL)-Reste, und bis-(Lysyl) Vernetzungen - 1,3-bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-1H-imidazolium (GOLD) und 1,3-bis(5-amino-5-carboxypentyl)-4-methyl-1H-imidazolium (MOLD). Für das Glyoxal gibt es ein weiteres kleines - Addukt aus Arginin,  $N_\omega$ -Carboxymethylarginin (CMA) (Abb. 2.4.). Das entsprechende Methylglyoxal-Addukt –  $N_\omega$ -Carboxyethylarginin – ist instabil und bisher noch nicht bestimmt. Aus Methylglyoxal wird auch eine kleine Menge eines fluoreszierenden Adduktes gebildet, genannt Argpyrimidine. Die große Modifikation von Proteinen durch Glyoxal und Methylglyoxal zeigen die Argininreste. Die Bildung von Hydroimidazolen verursacht strukturelle Verzerrungen, Verlust der Seitenkette-Ladung und damit eine funktionelle Beeinträchtigung (Thornalley, 2008).

Die DNA ist ebenfalls anfällig für Glykosylierung durch Glyoxal und Methylglyoxal – das unter physiologischen Bedingungen reaktivste Nukleotid ist das Deoxyguanosine (dG). Wenn

der  $\alpha$ -Oxoaldehyd limitiert ist – *in vivo*-Situation – sind die am häufigsten gebildeten AGEs die von Glyoxal abgeleiteten Imidazopurinon-Derivate 3-(2'-deoxyriboseyl)-6,7-dihydro-6,7-dihydroxyimidazo[2,3-b]purin-9(8)one (dG-G). Andere Addukte, wie  $N_2$ -Carboxymethyl-deoxyguanosin (CMDG) und 5-Glycolyl-deoxycytidine (GDC) sind von Glyoxal und Methylglyoxal abgeleitet (Abb.2.7.) (Thornalley, 2008).

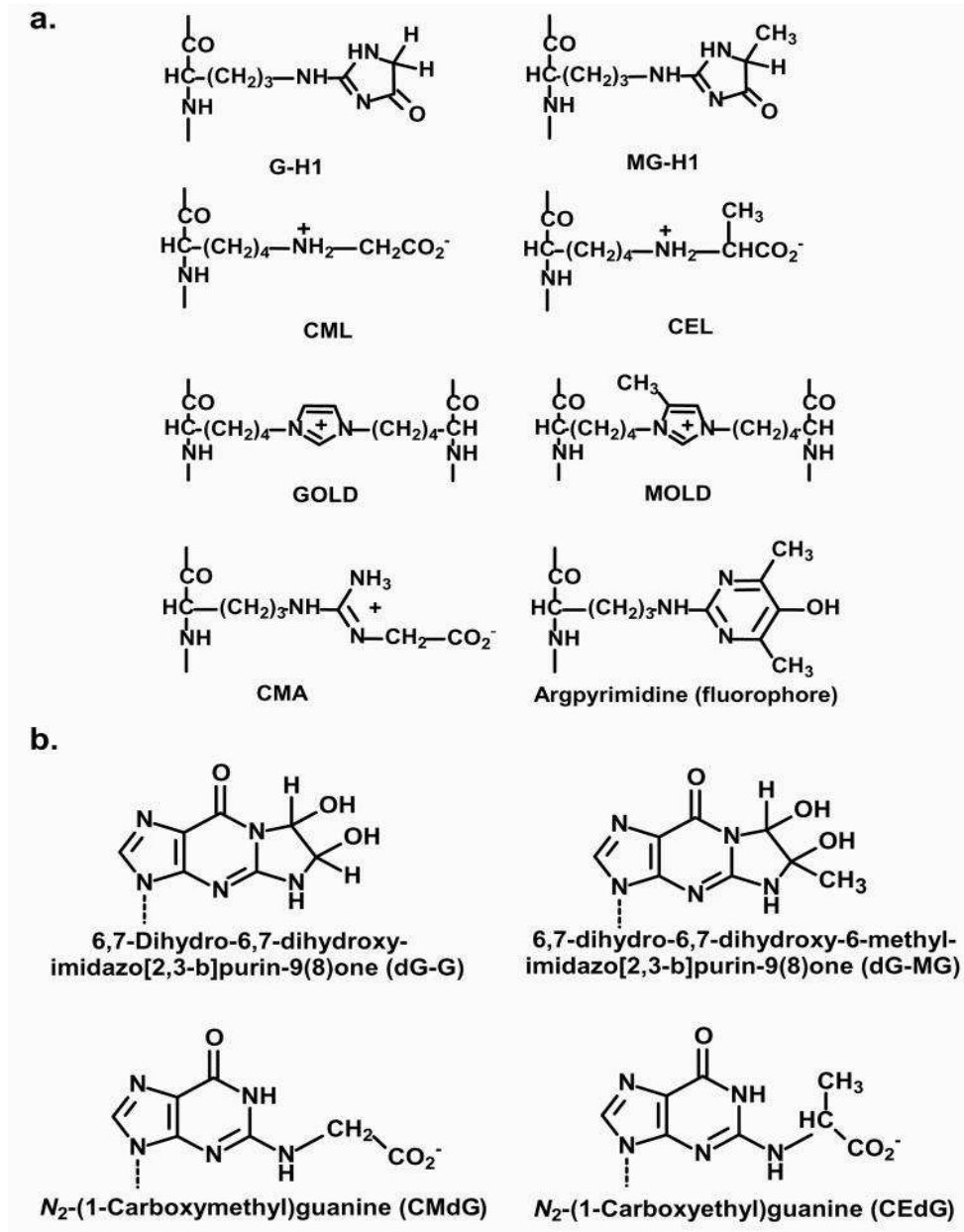


Abbildung 2.7. AGEs, die von Glyoxal und Methylglyoxal mit (a) Proteine und (b) Nukleotide gebildet sind (Thornalley, 2008).

### 2.3. Physiologische Folgen und Toxizität

Glyoxal und Methylglyoxal und andere Carbonyl-Produkte besitzen eine Toxizität, die auf einer hohen Reaktionsbereitschaft mit Proteinen und der DNA beruht. Sie wirken in Modell- und Tierversuchen cytotoxisch und antibakteriell (*Wieslander et al., 1995a*).

Methylglyoxal hat, wie auch andere Glukoseabbauprodukte, mutagene, kanzerogene und cytotoxische Wirkungen (*Mavric, 2006; Nagao et al., 1986; Wieslander et al., 1995; Okabe et al., 2004*). Von Nagao und ihren Mitarbeitern wurden die kanzerogenen Eigenschaften des Methylglyoxals im Versuch mit Ratten nachgewiesen, wobei eine Tumorbildung durch Zufütterung mit MGO über 20 Monate induziert wurde. Dieser Versuch hat auch gezeigt, dass das Methylglyoxal auch mutagen für *Salmonella typhimurium* TA100 und TA104 sowie gegen *E. coli* WP2 uvrA ist (*Nagao et al., 1995*). Die Mutagenität des MGO wurde auch im Kaffee nachgewiesen, wo 50 % des Gesamtmutagenpotentials auf Methylglyoxal zurückzuführen ist (*Kasai et al., 1982*).

Von *Wieslander et al. (1995)* wurden die Cytotoxizität der Dicarbonylverbindungen bzw. GO und MGO in hitzesterilisierten PD-Lösungen geprüft. Dazu wurden die einzelnen Verbindungen und die PD-Lösungen in L-929 Fibroblasten von Mäusen getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass Glyoxal und Methylglyoxal eine hemmende Wirkung auf die Zellen zeigen.

Für Glyoxal ist die ICG 20 (L-929)  $514 \pm 54$  und ICG 50 (L-929) ist  $903 \pm 81$ . Für Methylglyoxal ist die ICG 20 (L-929)  $99 \pm 11$  und ICG 50 (L929) ist  $164 \pm 19$ . ICG 20 % bzw. ICG 50 % Wert ist die Konzentration des Stoffes, die notwendig ist, um 20 bzw. 50 % der Zellen zu töten.

In einem anderen Test wurde auch die Cytotoxizität des Glyoxals und Methylglyoxals gegen humane peritoneale Mesothelzellen (HPMC-Zellen) geprüft (*Okabe et al. 2004*). Die HPMC-Zellen wurden mit den Dicarbonylverbindungen für 7 h und 10 h lang inkubiert und dann das Wachstum der Zellen bestimmt. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass das Methylglyoxal eine höhere cytotoxische Wirkung als Glyoxal aufweist.

Die Modifikationen von Proteinen und Nukleotiden durch die Glo1-Substrate (Glyoxal und Methylglyoxal) können als Schäden an physiologischen Systemen betrachtet werden. Dies wird durch die katalytische Wirkung des Glyoxalase-Systems – Glyoxal zur Glykolsäure, bzw. Methylglyoxal zur Milchsäure – verhindert. Die Glycation durch Glyoxal und Methylglyoxal und der damit verbundene Einfluss von Glo1 wird heutzutage verstärkt für die



Erklärung von Alterungs- und Krankheitsprozessen herangezogen (z.B. vaskuläre Komplikationen in Zusammenhang mit Diabetes, Nierenversagen, Alzheimer-Krankheit und Tumorgenese, sowie die Multiarzneimittelresistenz bei der Krebs-Chemotherapie). Sie können auch eine Rolle bei der pathologischen Angst, Autismus, Übergewicht und bei anderen Erkrankungen spielen (*Thornalley 2008*).

Das Methylglyoxal entsteht im Blut durch den Abbau von Glucose – besonders bei hohem Blutzuckerspiegel, bei Diabetikern, aber auch unabhängig davon. Körperzellen schützen sich vor diesem giftigen Zerfallsprodukt mithilfe von Glyoxalasen, die Methylglyoxal abbauen. In vielen Nervenzellen ist das Enzym nur schwach aktiv, bei Diabetikern ist seine Aktivität noch weiter reduziert. Das macht speziell Nervenzellen empfindlich gegenüber Methylglyoxal.

*Bierhaus et al., 2012* untersuchte daher, wie Methylglyoxal auf Nervenzellen wirkt, die für die Schmerzwahrnehmung zuständig sind. Das Methylglyoxal bindet an den Na-Kanal (NaV1.8), der nur bei Schmerzrezeptoren vorkommt, verändert seine Funktionsfähigkeit und macht so die Nervenzelle schneller erregbar. Diese Veränderung wurde im Nervengewebe von Mäusen gefunden, denen zuvor Methylglyoxal verabreicht worden war. Es wurde gefunden, dass auch bei Nervenzellen von Diabetes-Patienten mit erhöhter Schmerzempfindlichkeit die Na-Kanäle durch Methylglyoxal beeinflusst werden.

In einem Versuch wurde gesunden Mäuse Methylglyoxal injiziert. Diese entwickelten eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit, ähnlich wie kranke Mäuse mit Diabetes. Diese Schmerzempfindlichkeit ist durch die stärkere Durchblutung schmerzverarbeitender Hirnareale messbar (*Bierhaus et al., 2012*).

Ab einer bestimmten Konzentration sind Glyoxal und Methylglyoxal zelltoxisch. Die intraperitoneale Injektion der Mäuse mit Methylglyoxal ist toxisch, wobei die LD50 bei normalen Mäusen nach 24 h 290 mg/kg ist (*Schwartz und Manthei, 1964*). Nach *Conroy (1978)* ist die LD 50 8,4 mg/Tag.

Die orale LD50 des Methylglyoxals bei Ratten ist 1165 mg/kg<sup>2</sup>.

Das Glyoxal ist in den Tierversuchen an verschiedenen Spezies je nach Wirkstoffgehalt des geprüften Produktes als gering toxisch bis gesundheitsschädlich nachgewiesen. Orale LD 50 – Werte von 80 % und 100 % Glyoxal für Ratte entsprechen von 2000 bzw. 1400 mg/kg Körpergewicht. Der orale LD50 – Wert von 40-prozentigem Glyoxal ist für die Ratte von 762 bis 8979 mg/kg Körpergewicht. Die orale LD50 für 40 - prozentiges Glyoxal liegt bei der

---

<sup>2</sup> <http://web.guideonline.com>; zuletzt gelesen am 1.10.2013

Maus bei 4064 mg/kg Körpergewicht. Nach dermalen Aufnahme von 40-prozentigem Glyoxal betragen die LD – Werte bei der Ratte mehr als 2000, bei Kaninchen mehr als 12700<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup>[http://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL\\_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHES\\_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew177-K.pdf](http://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHES_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew177-K.pdf); zuletzt gelesen am 1.10.2013

## 2.4. Analytik

Die neuesten und modernsten Methoden nutzen eine Derivatisierung mit 1,2-Diaminobenzol und Gaschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (GC-MS) oder Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie-Detektion (LC-MS/MS) auf Basis der Isotopenverdünnungsanalyse (*Thornalley, 2008*).

Eine andere Methode basiert auf einer Reaktion zwischen Methylglyoxal (Glyoxal) und Cysteamin zu 2-Acetylthiazolidin bei pH 6. Dann wird das 2-Acetylthiazolidin mit Dichlormethan extrahiert und anschließend mittels eines Gaschromatographen analysiert, der mit einer Fused Silica Kapillare-Säule und thermoionischem Detektor ausgestattet ist (*Hayashi und Shibamoto, 1975*). Es ist eine Methode zur Bestimmung des Glyoxals bekannt, die die Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) verwendet und dann wird mittels HPLC analysiert (*Nakajima et al. 2007*).

Ein weiteres empfindliches und einfaches flüssigchromatographisches Verfahren, um die Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl zu analysieren basiert auf der Umwandlung zu den entsprechenden Pteridin-Derivaten (Pterin, 6-Methylpterin und 6,7-Dimethylpterin). Das vorgeschlagene Verfahren wurde unter Verwendung fluorimetrischer Detektion zur Bestimmung der drei  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen in menschlichem Urin angewendet. In diesem Beitrag wird ein neues Verfahren zur Derivatisierung von  $\alpha$ -Dicarbonyl Verbindungen präsentiert, um Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl mit Hilfe der Reverse Phase HPLC im Urin zu bestimmen. Das Verfahren beruht auf der Umsetzung der Basis  $\alpha$ -Dialdehyde mit 6-Hydroxy-2,4,5-triaminopyrimidin (TRI1), um die fluoreszierenden Pterinderivate zu bilden. Das Pterin, 6-Methylpterin und 6,7-Dimethylpterin wird aus Glyoxal, Methylglyoxal und Diacetyl gebildet (*Espinosa-Mansilla et al., 1998*).

Zur Analytik von  $\alpha$ -Dicarbonylen können je nach Probenmaterial unterschiedliche RP-HPLC Methoden verwendet werden. Eine der Methode ist auf Derivatisierung mit o-Phenylendiamin (OPD) basiert. Das Verfahren beruht auf die Trennung der Chinoxalinderivate der Dicarbonyle nach Reaktion mit o-Phenylendiamin (*Nilsson-Thorell et al., 1993; Mavric et al. 2008*).

Die Methode für die Bestimmung von Glyoxal (GO) und Methylglyoxal (MGO), sowie 3-Desoxyglucosulose (3-DG), im Peritonealdialysat (PD) basiert auf dem oben beschriebenen

Verfahren (*Nilsson-Thorell et al., 1993*), wobei der zeitliche Verlauf des Acetonitril/Wasser-Gradienten leicht verändert wurde. Für die Analyse der  $\alpha$ -Dicarbonyle im PD wurde ein Acetonitril/Wasser-Gradient genutzt (im Falle der Honigproben ist ein Methanol-Essigsäure-Gradient notwendig) (*Weigel, 2004*).

## 2.5. Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmitteln. Bioverfügbarkeit

Glyoxal und Methylglyoxal wurden in vielen Lebensmitteln und fermentierten Produkten gefunden, wie Brot, gekochte Kartoffeln, karamellisierte Saccharose, gerösteten Kaffee, verschiedene Backwaren, Honig, Essig, Bier, Wein. Es wurde Methylglyoxal in Lebensmitteln detektiert – zuerst im Kaffee mit einem Gehalt von 1,6 bis 7 mg/l und in fermentierten Lebensmittel wie Wein (0,1 – 2,9 mg/l), in Joghurt (0,6 – 1,3 mg/l) und in Sojasauce (8,7 mg/kg) (*Nagao et al. 1986; De Revel und Bertrand, 1993; Yamaguchi 1994*). Ein besonders hoher Gehalt an Methylglyoxal wurde in neuseeländischem Manuka-Honig gemessen. Während handelsübliche Honige Methylglyoxal-Gehalte von maximal 1 – 2 mg/kg aufwiesen, wurden für Manuka-Honige Gehalte von 189 bis 835 mg/kg gefunden (*Atrott und Henle, 2009*). Die für die Manuka-Honige gemessenen Gehalte an Methylglyoxal sind unmittelbar für die antibakterielle Wirkung der Honige verantwortlich. Dotiert man einen unwirksamen kommerziellen Waldhonig mit vergleichbaren Mengen an Methylglyoxal, so kann für diesen eine entsprechende antibakterielle Wirkung erwartet werden. (*Henle, 2007*). Die letzten Schätzungen der Konzentrationen von Methylglyoxal und Glyoxal in menschlichem Blutplasma liegen im Bereich 100 – 120 nM (*Beisswenger et al. 1999; Strzinek et al. 1972*) und zelluläre Konzentrationen von Methylglyoxal (1 – 5  $\mu$ M) und Glyoxal (0,1 – 1  $\mu$ M) (*Dobler et al., 2006*).

Es gibt eine geringe Bioverfügbarkeit von AGEs (Advanced Glycation Endproducts) bzw. Glyoxal und MGO gebunden an Proteine in den Lebensmitteln. Sie werden mit <10 % absorbiert. Dies führt zu einer reduzierten Proteolyse der stark glykosylierten Proteine in Lebensmitteln. Einige AGEs können die intestinalen Proteasen hemmen. Die höchste Konzentration der absorbierten AGEs ist im Pfortader-Plasma zu erwarten, wo die Hydroimidazolone MG-H1 10-fach höher in den Peptiden sind. (*Thornalley, 2008*)

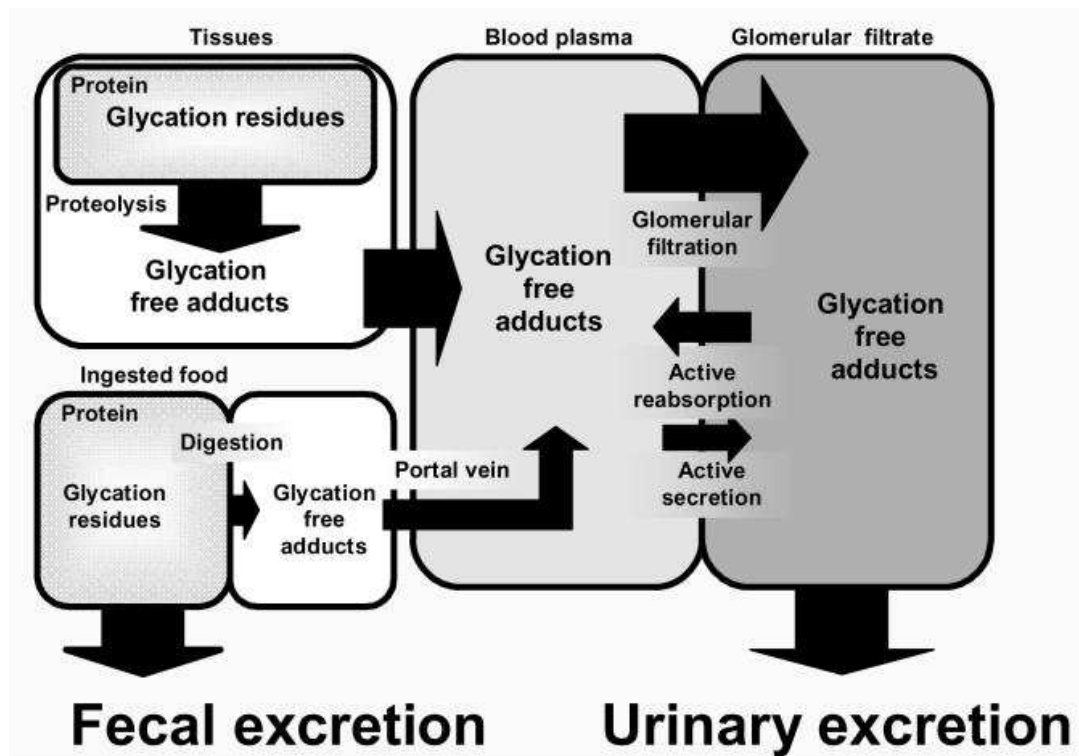


Abbildung 2.8. Schema der – Bildung und Entfernung von glykosylierten Proteinen (Thornalley, 2008).

## 2.6. HPLC

*Die Hochleistungsflüssigkeitschromatografie (HPLC) ist ein Analyseverfahren in der Chemie. Man verwendet es zur Trennung von Substanzen sowie zur Bestimmung der Konzentrationen. Mit dieser analytischen HPLC Methode kann man im Gegensatz zur Gaschromatographie insbesondere polare Substanzen untersuchen. Das Flüssigchromatographie-Verfahren kann darüber hinaus auch präparativ verwendet werden<sup>4</sup>.*

HPLC ist in den 60er Jahren aus der Säulenchromatographie entwickelt wurde. Bei der HPLC-Methode findet die chromatographische Trennung in einer Säule zwischen zwei Phasen – mobile und stationäre Phase – statt. Die stationäre Phase auf einem porösen Träger ist eine Säule gepackt. Die mobile Phase ist ein Laufmittel, das mit hohem Druck durch die Säule gepresst wird. Die HPLC wird wegen der Verwendung von hohem Druck auch Hoch-Druck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography) genannt. Es wurde festgestellt, dass diese Methode effektiver ist als die Säulenchromatografie und die zu untersuchenden Substanzen besser getrennt werden können. HPLC-Methode wird auch zur Reinigung von Substanzgemischen verwendet. Diese Methode liefert eine gute Trennung in kurzer Zeit. Bei der HPLC können verschiedene Arten der Chromatographie durchgeführt werden. Dazu gehören: Adsorptionschromatographie, Affinitätschromatographie, Ionenpaarchromatographie, Gelchromatographie. Die HPLC ist in der analytischen, klinischen Chemie, sowie in der Biochemie sehr oft anwendbar<sup>5</sup>.

*Die Stoffe, die chromatographisch getrennt werden, wandern verschieden schnell durch die Säule. Stoffe, die sich bevorzugt in der mobilen Phase aufhalten, wandern schneller durch die Säule als Stoffe, die sich bevorzugt auf der stationären Phase aufhalten<sup>5</sup>.*

Bei der Chromatographie sollte man die mobile Phase nach bestimmten Eigenschaften auswählen. Sie sollte in Wechselwirkung mit der geeigneten stationären Phase das Gemisch möglichst schnell trennen. Das Lösungsmittel darf mit der Substanz nicht reagieren. Die stationäre Phase kann auf Basis von Silicagel oder Aluminiumoxid beruhen. Die Pumpe erzeugt einen hohen Druck in der mobilen Phase. Es ist ein hoher Druck notwendig, damit die mobile Phase mit einer annehmbaren Geschwindigkeit (Flussrate) durch die Säule fließen kann. Detektoren sind Meßwandler, die das Ausströmen der Komponenten aus der Säule meßbar erfassen und in ein elektrisches Signal umwandeln, das zur Anzeige und

---

<sup>4</sup> <http://honig-analyse.de>, zuletzt gelesen am 13.10.2013

<sup>5</sup> <http://www.umweltlabor.de/Labor/hplc.htm#1>. Informationen über die HPLC; zuletzt gelesen am 13.10.2013

Registrierung auf dem Schreiber dienen kann. Es gibt verschiedene Detektoren. Die UV-Detektoren sind die häufigsten verwendeten Detektoren. Sie registrieren die Stoffe, die UV-Licht absorbieren.

Die getrennten Substanzen werden von der mobilen Phase in den Detektor transportiert und vom Schreiber registriert. *Die Signale nennt man Peaks und die Gesamtheit aller Peaks nennt man Chromatogramm. Die Peaks liefern bei der HPLC ein qualitatives und ein quantitatives Ergebnis über die zu untersuchende Substanz. Bei gleichgewählten Bedingungen ist die Elutionszeit (Zeit, nach der das Signal geschrieben wird) für jeden Stoff eines Gemisches charakteristisch und die Fläche jedes Signals ist proportional zur Menge des gefundenen Stoffes.* Die Retentionszeit ist eine wichtige Komponente zur Identifizierung einer unbekannter Substanz. Sie wird zwischen der unbekanntem und der Standardsubstanz verglichen<sup>5</sup>.

*Bei der HPLC-Methode werden zwei Methoden unterschieden – die Normalphase (NP) und die Umkehrphase (Reversed Phase, RP). Für die Normalphase (NP-HPLC) wird eine polare stationäre Phase (z.B. Kieselgel) verwendet. Gleichzeitig besitzt die mobile Phase entsprechend ihrer Polarität eine unterschiedlich starke Elutionskraft. Grundsätzlich gilt bei der Normalphase, je polarer eine mobile Phase ist, desto schneller wird die Substanz eluiert. Die Umkehrphase (RP-HPLC) wird in der Praxis häufiger verwendet als die NP-HPLC. Bei dieser Methode wird eine unpolare stationäre Phase verwendet. Je größer ist die Polarität, desto geringer wirkt die Elutionskraft. Die stationäre Phase wird durch eine Umsetzung von Silanen mit Silicagel synthetisiert wobei die polare Oberfläche der Silicagel-Partikel eine unpolare Schicht erhält. Dieser Vorgang kennzeichnet im Wesentlichen die Umkehrphase<sup>4</sup>.*

Die Anwendungsgebiete der HPLC-Methode sind vielfältig. In der chemischen Industrie werden Trennsäulen verwendet, die einen Durchmesser von bis zu 1 m haben. Momentan arbeiten die Hersteller von HPLC-Apparaturen an neuen Entwicklungen, die einen erweiterten Probendurchsatz ermöglichen und das Trennungsverfahren beschleunigen sollen<sup>4</sup>.



## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Chemikalien, Geräte und Hilfsmaterialien**

#### ***3.1.1. Chemikalien***

Glyoxal 40% ige Lösung – Carl Roth GmbH and Co.KG Karlsruhe Germany

Methylglyoxal 40%ige Lösung – Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim

Orthophenylendiamin – Merck Darmstadt

Methanol (HPLC – Qualität) – J.T. Baker Netherlands

Acetonitril Optigrade – Promochem LGC Standards GmbH

n- Hexan – Carl Roth GmbH Karlsruhe Germany

Essigsäure - Carl Roth GmbH and Co.KG Karlsruhe Germany

#### ***3.1.2. Geräte:***

Eppendorf Centrifuge 5804 R

Vortex

HPLC HP series 1100.

UV-Detektor

Säulen:

Lichrospher 125 RP-18; 5  $\mu\text{m}$ ; 100  $\times$  4,6 mm, mit integrierter 14mm - Vorsäule

Phenomenex Gemini® 3  $\mu\text{m}$  C18 110 Å, LC Column 150  $\times$  3 mm

#### ***3.1.3. Hilfsmaterialien***

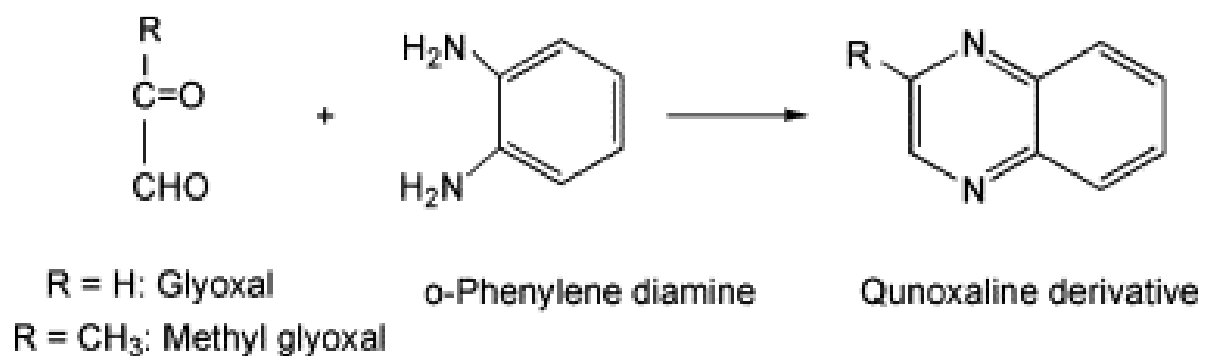
Mikropipetten 0,2ml ; 1 ml - Eppendorf

Vials 1,5 ml Agilent

Maßkolben

### 3.2. Methode zur Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal

Die Bestimmung von Glyoxal (GO) und Methylglyoxal (MGO) und andere  $\alpha$ -Carbonylverbindungen erfolgt mittels HPLC und UV-Detektion nach Derivatisierung mit o-Phenylendiamin. Die gebildeten entsprechenden Chinoxalinderivate zeigen eine charakteristische UV Absorption und sind im Vergleich zu den Ausgangsprodukten weniger reaktiv.



**Abbildung. 3.1. Derivatisierung von GO und MGO mit o-Phenylendiamin zu den entsprechenden Chinoxalinderivaten.**

Für die Kalibration wird ein externer Standard vorbereitet. Die wässrigen Stammlösungen enthalten jeweils Glyoxal (GO) und Methylglyoxal (MGO) in Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  für GO und 1  $\mu\text{g/ml}$  für MGO. Die Lösungen werden in Volumenverhältnis 1:1 vermischt (z.B. je ein Teil GO und ein Teil MGO mit 8 Teilen Wasser für Konzentrationen von 1  $\mu\text{g/ml}$  GO und 1  $\mu\text{g/ml}$  MGO) und die gemeinsame Referenzlösung zur Kalibration entsprechend verdünnt. Die Zuordnung der Peaks in den Proben erfolgt über den Vergleich der Retentionszeiten der Standardverbindungen.

#### **Phosphatpuffer-Herstellung:**

pH	X ml 0,5 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Y ml 0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
7	30,5	19,5

0,5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 89,025 g/l Lösung

0,5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O – 69,005 g/l Lösung

### 3.2.1. Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmittel

#### 3.2.1.1. Probenvorbereitung für die Bestimmung von 1,2-Dicarbonylverbindungen (Glyoxal und Methylglyoxal)

Um 1,2-Dicarbonylverbindungen mittels RP-HPLC und UV-Detektion bestimmen zu können, müssen sie in UV-aktive Chinoxaline überführt werden. Dazu 1 ml der Probelösung mit 0,3 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,0 und 0,3 ml einer 0,2 %-igen wässrigen o-Phenylendiamin Lösung (OPD) versetzen und 24 h lang im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen lassen. Die Proben zentrifugieren und anschließend mittels RP-HPLC analysieren. Die Messung durch HPLC wurde bei den folgenden Parametren durchgeführt:

#### *Analytische RP-HPLC*

Säule: Lichrospher 125 RP-18; 5 µm; 100 × 4,6 mm, mit integrierter 14 mm- Vorsäule

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

Flussrate: 0,6 ml/ min

Detektion/Wellenlänge: 318 nm

Elution: Fließmittel A: 0,075 % Essigsäure in Wasser;

Fließmittel B: Methanol (HPLC-Qualität)

50 % Fließmittel A und 50 % Fließmittel B (isokratische Elution)

#### 3.2.1.2. Validierung der Methode

Um die Methode und die optimale Zeit zur Derivatisierung von Glyoxal und Methylglyoxal mit o-Phenylendiamin zu überprüfen, werden verschiedenen Konzentrationen der Standardproben hergestellt und dann diese nach verschiedenen Reaktionszeiten (8 h, 24 h, 32h und 48 h) mit dem HPLC gemessen.

Die Kalibration wurde nach der oben beschriebenen Methode zur Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmittel gemacht. Zur Kalibration wurden Standardproben mit verschiedenen Konzentrationen von den Reinsubstanzen Glyoxal und Methylglyoxal – von 0,1 bis 1 µg/ml vorbereitet und diese dann mit HPLC bei definierten Parametren vermessen.

*Tabelle 3.1 . Konzentration der Standardproben zur Kalibration.*

<b>Glyoxal</b>	<b>Methylglyoxal</b>
<b>Konzentration, ng/ml</b>	<b>Konzentration, ng/ml</b>
<b>100</b>	<b>100</b>
<b>250</b>	<b>250</b>
<b>500</b>	<b>500</b>
<b>750</b>	<b>750</b>
<b>1000</b>	<b>1000</b>

### 3.2.2. Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Blutplasma

#### Validierung der Methode mit Rinderblut.

Vorbereitung des Blutplasmas:

- Das Blut wird zentrifugiert (nach ca. 1 h nach dem Schlachten) und das Blutserum von zellulären Bestandteilen zu trennen (20 min, 14000 rpm)
- 100 µl (200 µl) Blutserum werden für die Proben verwendet.

#### **3.2.2.1. Probenvorbereitung zur Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Blutserum**

100 µl Blutserum werden mit 100 µl Acetonitril versetzt (in Verhältnis 1:1), damit die Proteinen koagulieren, dann zentrifugieren – 20 min bei 14000rpm. Zum Überstand wird Wasser auf 1 ml zugegeben. Derivatisierung wird mit 0,3 ml 0,5 M Phosphatpuffer pH 7 und 0,3 ml 0,2% o-Phenylendiamin-Lösung durchgeführt. Die Proben müssen 24 h bei Raumtemperatur im Dunkel stehen lassen. Dann sie zentrifugieren für 20 min bei 14000 rpm und mittels RP-HPLC analysieren.

Für die Kalibration wird das Blutserum (+ACN) mit Glyoxal-Methylglyoxal-Stammlösung in verschiedenen Konzentrationen vermischt (0,2 – 2 µg/ml) und dann Derivatisieren nach der oben beschriebenen Methode und Messen mittels HPLC.

#### **Analytische RP-HPLC:**

Säulen:

Phenomenex Gemini® 3 µm C18 110 Å, LC Column 150 × 3 mm

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

Flussrate: 0,4; 0,6 ml/ min

Wellenlänge: 318 nm

Elution: 50% Fließmittel **A** und 50% Fließmittel **B**

Fließmittel A: 0,075 % Essigsäure in Wasser; Fließmittel

B: Methanol (HPLC-Qualität)

### **3.2.2.2. Validierung der Methode**

Um die Methode und die optimale Zeit zu Derivatisierung von Glyoxal und Methylglyoxal mit o-Phenylendiamin zu überprüfen, werden verschiedenen Konzentrationen der Standardproben hergestellt und dann diese nach verschiedenen Reaktionszeiten (8 h, 16 h, 24 h, 32 h und 48 h) mit dem HPLC vermessen (Tabelle 3.2). Außerdem ist bei der Probenvorbereitung die Zeit der Zugabe von Acetonitril zu dem Blutserum unterschiedlich, wie folgt:

- t = 0 (sofort);
- t = 10 min;
- t = 30 min;
- t = 60 min;

### **3.2.2.3. Kalibration**

Die Kalibration wurde nach oben geschriebene Methode zur Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Blutserum gemacht. Für die Kalibration werden verschiedene Konzentrationen der Glyoxals und Methylglyoxals in Standardproben verwendet (Tabelle 3.1.).

Zur Validierung und Kalibration der Methode wurde Blutserum von Rind verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmittel

#### 4.1.1. Validierung

Die Validierung zeigt gute definierte Peaks und größere Fläche (Area) der Peaks nach einer Derivatisierungszeit von 24 Stunden im Vergleich zu 8 bzw. 12 Stunde. Darum wurde die Derivatisierungszeit für die Lebensmittelproben mit 24 h angesetzt.

#### 4.1.2. Kalibration

Die Kalibration wurde im Bereich von 100 ng/ml bis 1000 ng/ml durchgeführt (Tabelle 4.1.). Die angegebenen und ausgewerteten Resultate beschreiben eine gute Kalibrationsgerade für das Glyoxal, sowie auch für das Methylglyoxal (Abb. 4.1 und 4.2.). Die errechneten Flächen der Peaks für die Glyoxal- und Methylglyoxal-Standards sind vergleichbar:

**Tabelle 4.1. Standardskalibration.**

Konzentration, ng/ ml	Glyoxal		Methylglyoxal	
	Konzentration, mmol/l	Area, mAU	Konzentration, mmol/l	Area, mAU
100	0,0017	3,3	0,0013	3,4
250	0,0043	8,5	0,0034	8,3
500	0,0086	16,5	0,0069	16,1
750	0,0129	24,3	0,0104	24,3
1000	0,0172	34,9	0,0138	34,1

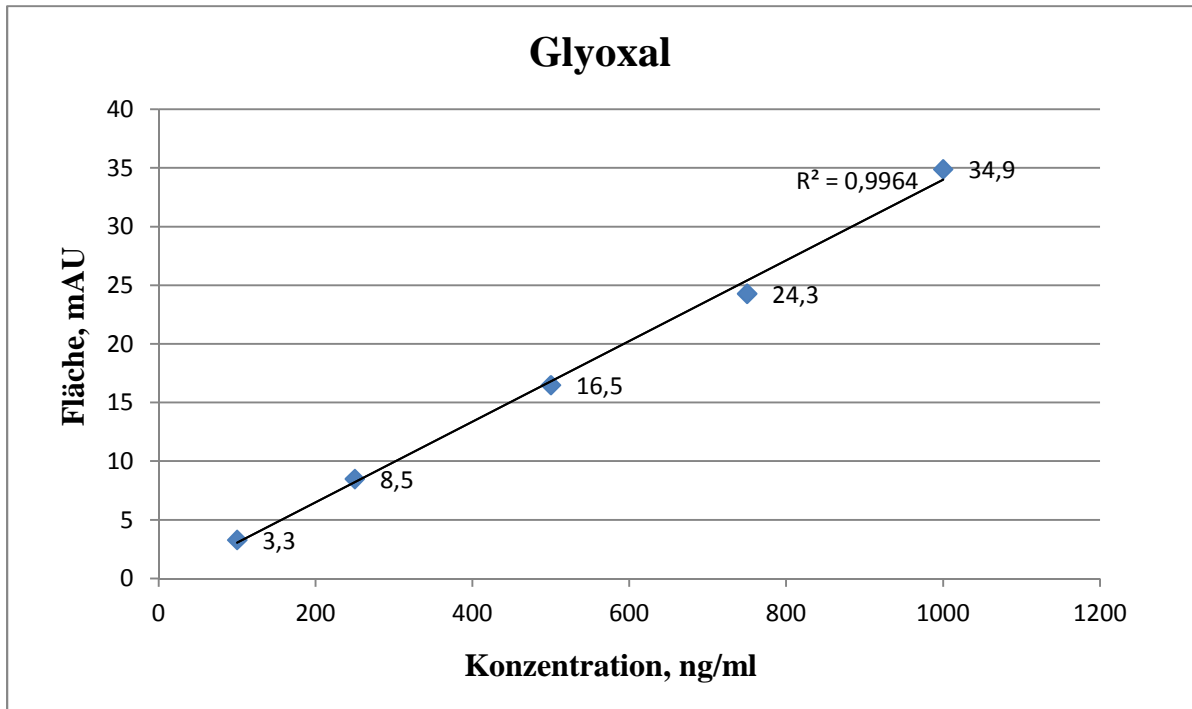


Abbildung 4.1. Kalibrationsgerade für das Glyoxal.

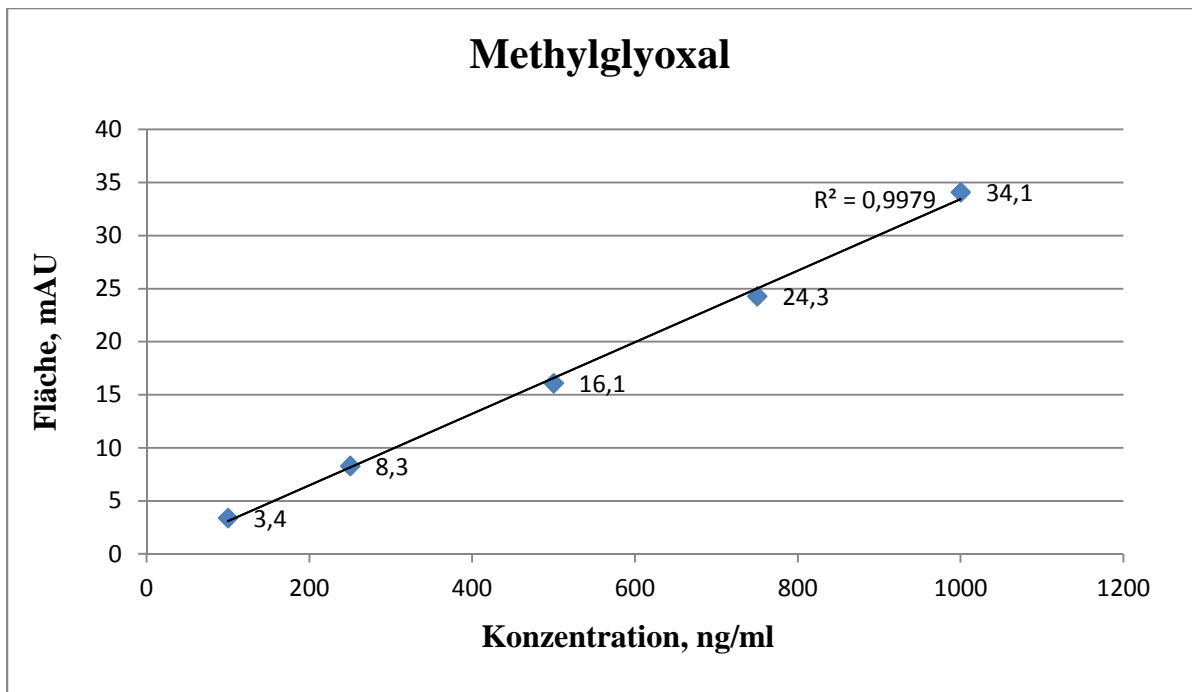


Abbildung 4.2. Kalibrationsgerade für Methylglyoxal.



Die erstellten Kalibrationsgeraden für Glyoxal und Methylglyoxal geben die erforderliche Grundlage für die Berechnung der Konzentrationen von Glyoxal und Methylglyoxal in den Lebensmittelproben.

#### **4.1.3. Bestimmung der Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmittelproben**

Die gemessenen und berechneten Gehalte an Glyoxal und Methylglyoxal in Lebensmittelproben, die durch die oben beschriebenen Methode (s. 3.2.1.) vorbereitet und bei den definierten Parametern gemessen wurden, sind in Tabelle 4.2. zu sehen:

**Tabelle 4.2. Gehalt an Glyoxal und Methylglyoxal in diversen Lebensmittelproben (Probenbezeichnung auf Norwegisch, da die Proben in Norwegen gekauft wurden).**

<b>Nr</b>	<b>Probenbezeichnung</b>	<b>GO [µg/g]</b>	<b>MGO [µg/g]</b>
1	Coffee, filtermalt, Evergood pulver	3,9	103
2	Coffee, instant Nescafe Brasero pulver	n.q.	48,4
3	Coffee, instant Nescafe Gull pulver	12,4	57,5
4	Peanuts, Polly	-	-
5	Chips (potetgull), Kim's fredags mix	7,4	9,2
6	Chips (potetgull), Pringles original	4,5	6,7
7	Saltstenger (Salzstangerl), Soletti	20,0	n.q.
8	Lompe, Aulie	1,3	
9	Honney, Honning centralen	1,5	2,7
10	Maryland Cookies, Choc chip & hazelnut	12,3	20,9
11	Crisp bread (knekkebrød), Wasa husman	n.q.	11,6
12	Crisp bread (knekkebrød), Rug-sprø originale	n.q.	7,6
13	Crisp bread (knekkebrød), Wasa solruta spelt/dinkel	n.q.	15,1
14	Chocolate, Snickers with peanutts	2,2	5,4
15	Chocolate, Freia melkesjokolade	2,4	4,0
16	Buns with cinnamon and sugar, Pågens giffjar	2,2	5,6
17	Cereal, Axa God'dag fruktmüsli	5,9	n.q.
18	Soft tortilla, First Price	-	-
19	Kaviar, Mills	6,2	3,2
20	Gauda Cheese, Jarlsberg	0,0	0,0
21	Norwegian goat cheese, Tine Ekte gritost	3,2	10,7
22	Youghurt, Tine Jordbær	-	-
23	Youghurt, Tine skogsbær + müsli	1,8	3,8
24	Orange juice, Tine original appelsinjuice	-	-

25	Fuite juice, Tropicana pur premium, smooth style	-	0,0
26	Beverage, Coca Cola, originale	0,0	0,0
27	Beverage, Solo	0,0	0,0
28	Jam raspberry, Nora hjemmelaget bringebærsyltetøy	-	-
29	Jam strawberry, Nora hjemmelaget jordbær syltetøy	-	-
30	Fish in tomatosauce, Stabburets Makrell i tomat med hel fisk	2,1	2,2
31	Leverpostei, Stabburets ferske leverpostei	2,2	n.q.
32	Pizza, Dr. Oetker Casa de Mama Pepperoni-salame	0,8	n.q.
33	Pizza, Stabburet Grandiosa normal	1,0	n.q.
34	Pastasauce, Dolmio classico pastasaus	0,3	3,1
35	Stew, Lys lapskaus Trondhjems	0,3	0,9
36	Meat balls in sauce, Trondhjems kjøttkaker i brun saus	1,5	2,3
37	Meatsoup, Toro kjøttsuppe med grønnsaker	-	-
38	Mashed potatoes, Mills potetmos vanlig	-	-
39	Bread, Bakers spesial kneip	2,1	3,7
40	Bread, Vita Hjertegod ekstra grove rundstykker	0,4	-
41	Raisins, Sun-maid rosiner		8,5
42	Svisker, Sunsweet	n.q.	7,4
43	Ketchup, Idun tomatketchup	-	-
44	Mayonaise, Mills ekte majones	-	0,0
45	Coffee ready-to-drink, Evergood filter coffee	-	6,5
46	Coffee ready-to-drink, Friele filter coffee	1,5	30,3
47	Pasta, Barilla pasta Penne rigate	-	-
48	Potatoes baked in the oven, bakte båt poteter	-	-
49	Potatoes boiled, kokte skrelte poteter	-	-
50	Milk, Tine lettmelk	-	-
51	Vegetable soup	-	-
52	Meatsauce, Knorr kjøttkakesaus	-	-
53	Hvite sauce, Toro hvit saus	-	-
54	Coffee ready-to-drink, Kaffebrenneriert vanlig type	-	7,9
55	Coffee double cappucino ready-to-drink, Kaffebrenneriet	-	5,5
56	Coffee Cappuciono ready-to-drink, Deli DeLuca	-	4,6
57	Beer, Carlsberg premium beer	-	-
58	Beer, Frydenlund Juleøl	-	-

**Legende:**

n.q. – nicht quantifizierbar

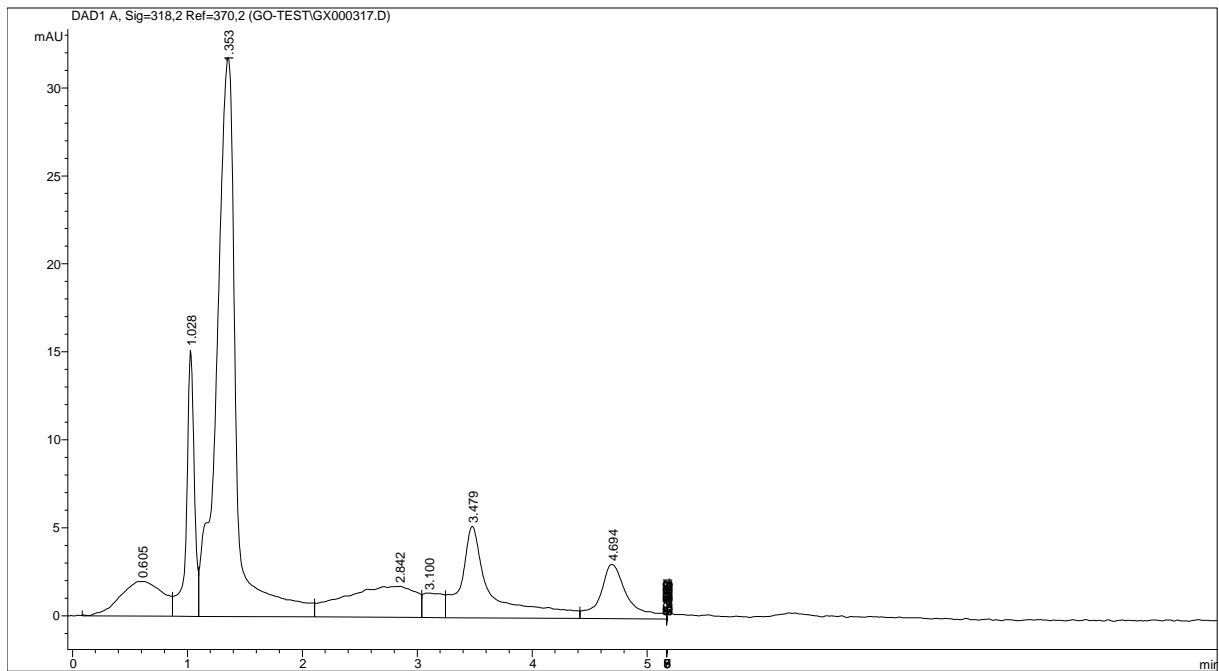
Die Lebensmittelprodukte zur Analyse können in einigen Gruppen verteilen:

- Backwaren;
- Kaffee-Getränke;
- Gekochte Speisen;
- Milchprodukte;
- Verschiedene alkoholfreie und leicht alkoholhaltige Getränke;
- Süßwaren;
- Andere.

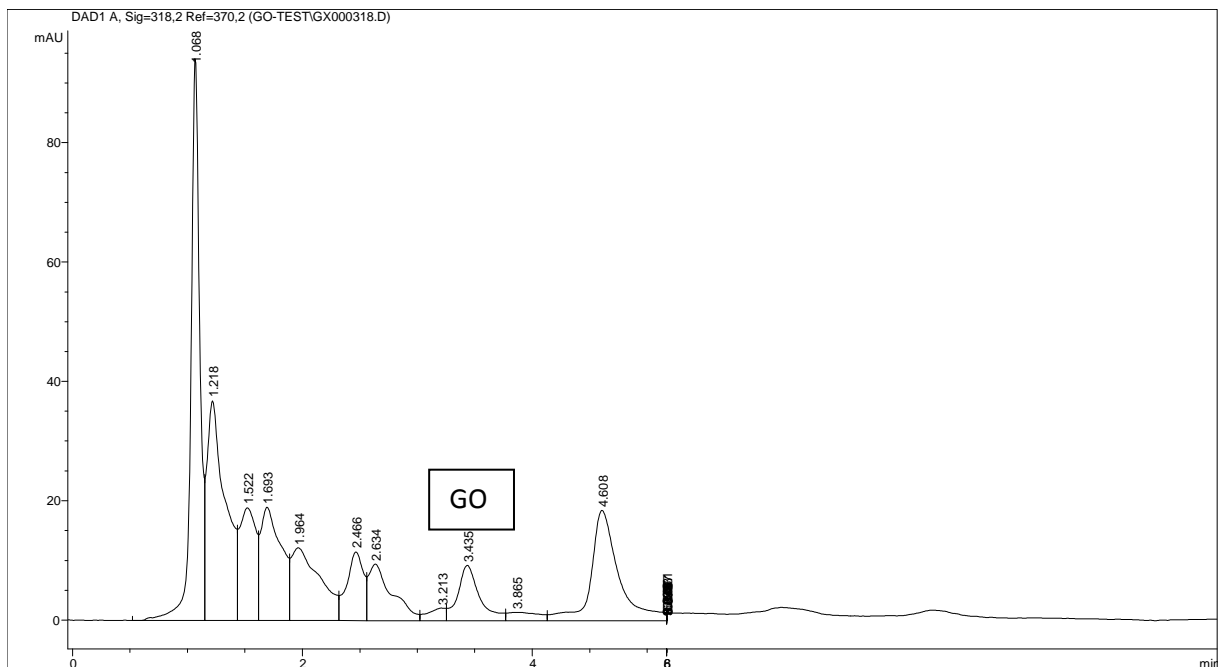
Die beiden Gruppen – Backwaren und Kaffee – enthalten eine höhere Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal im Vergleich zu den anderen Gruppen. Einen besonders hohen Gehalt an Methylglyoxal besitzen einige Kaffeeproben, wie die Proben 1 (103 µg/g), 2 (48,4 µg/g), 3 (57,5 µg/g) und 46 (30,3 µg/g). Insgesamt zeigten alle Proben mit Kaffee eine hohe Konzentration von Methylglyoxal. Dann kommen die Backwaren, die auch einen hohen Gehalt an Methylglyoxal besitzen – von 5,4 bis 20,9 µg/g. Die Kekssprobe (Marylend Cookies) ergab den höchsten Wert an Methylglyoxal – 20,9 µg/g, dann folgen verschiedene Knäckebrote (von 7,6 µg/g bis 15,1 µg/g) und Chips mit einer Konzentration von 9,2 µg/g (Probe Nr. 5). Die Proben „Norwegian Goat Cheese“ (Ziegenkäse; 10,7 µg/g) und Rosinen (8,5 µg/g) sind ebenfalls Proben mit höheren Gehalten. Die anderen Milchprodukte und die Gruppe der gekochten Speisen zeigten vergleichsweise niedrigen oder gar keinen Gehalt an Methylglyoxal. Auch in den Getränken wurde kein Methylglyoxal gefunden. Einige der Süßwaren enthielten mittlere Werte an Methylglyoxals.

Die Backwaren und einige Proben mit Kaffee besitzen auch einen hohen Gehalt an Glyoxal. Die höchste Konzentration von der Substanz wurde in der Salzstangen-Probe mit 20,0 µg/g gefunden. Ebenfalls hohe Werte ergab die Analyse von einer Kaffee-Probe 1 mit 12,4 µg/g, Kekse (Marylend Cookies) mit 12,3 µg/g und Chips mit 7,4 µg/g (Probe Nr. 5). Ein hoher Gehalt an Glyoxal wurde in der Kaviar-Probe (6,2 µg/g) sowie in Fruchtmüsli (5,9 µg/g) gefunden. Norwegian Goat Cheese ist wieder in den ersten zehn Proben, die die höchsten Werte für Glyoxal ausweisen.

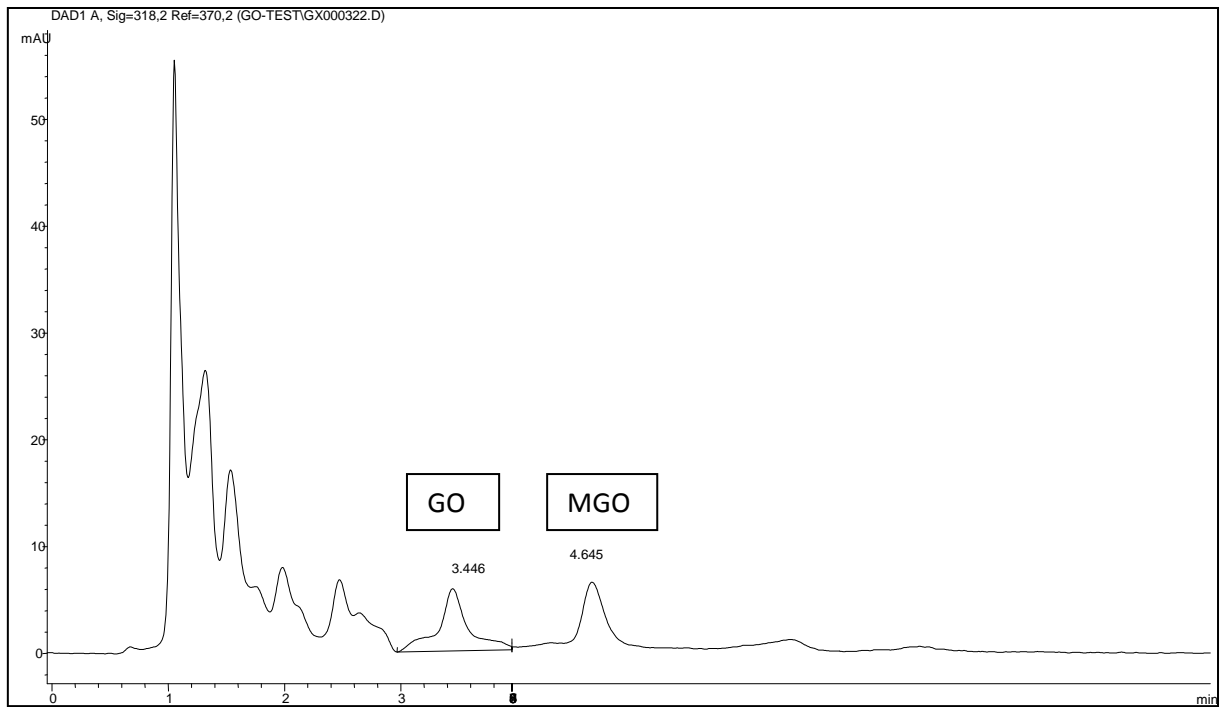
Insgesamt ist der Gehalt an Methylglyoxal in den alle gemessenen Proben zur Analyse höher als diesen an Glyoxal.



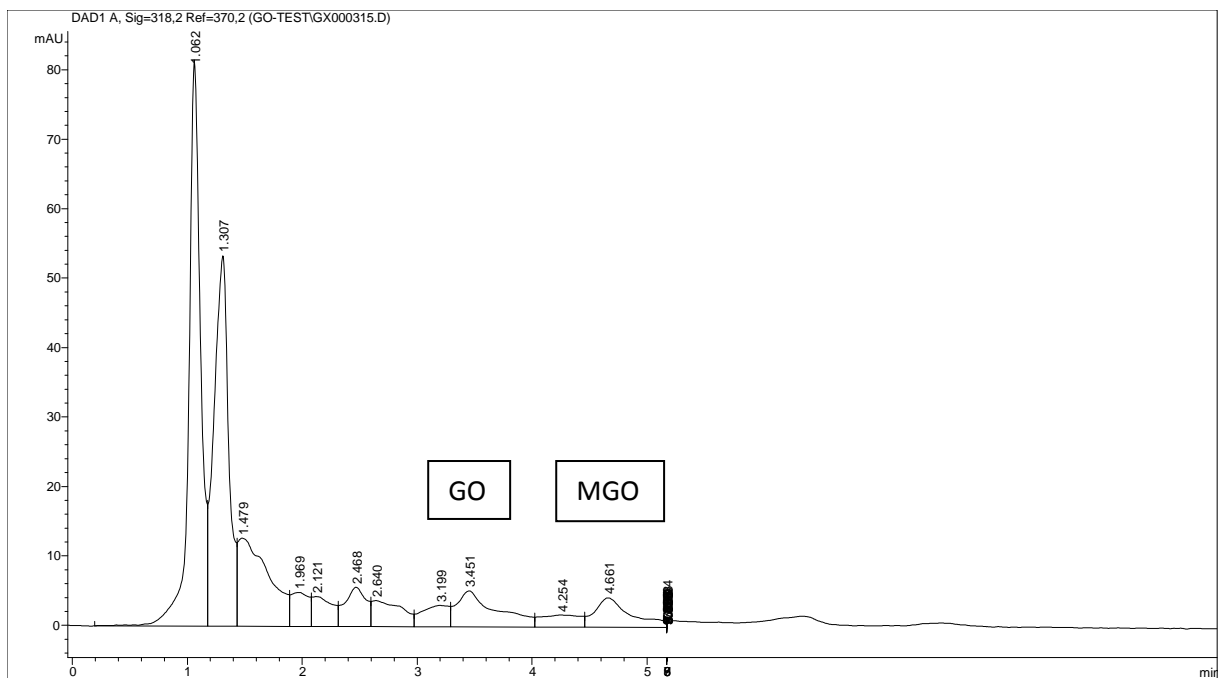
**Abbildung 4.3. Chromatogramm eines Standardgemisches mit einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml. RT für Glyoxal ist 3,479 min, RT für Methylglyoxal ist 4,694 min.**



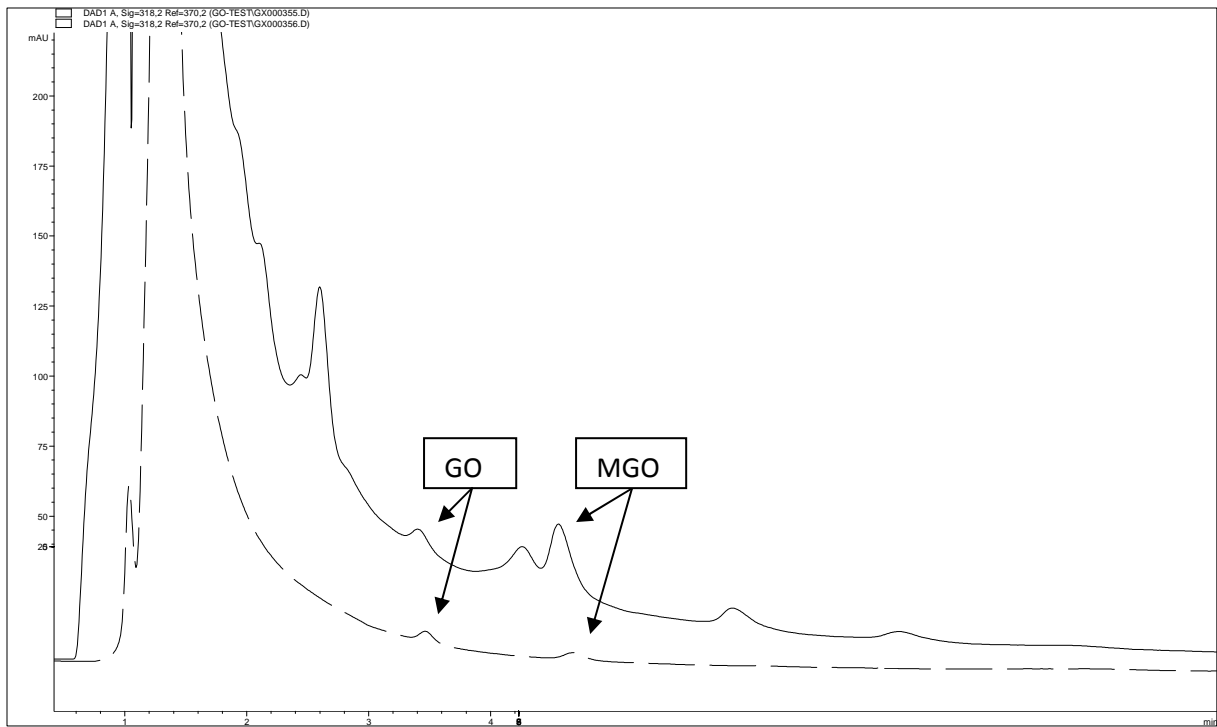
**Abbildung 4.4. Chromatogramm der Salzstangen-Probe, die die höchste Konzentration an Glyoxal enthielt (20,0 µg/g). RT für Glyoxal ist 3,435 min.**



**Abbildung 4. 5. Chromatogramm von Probe Nr. 10 Maryland Cookies, die eine relativ hohe Konzentration von Glyoxal (12,3 µg/g) und Methylglyoxal (20,9 µg/g) aufweisen.**



**Abbildung 4.6. Chromatogramm von einer Probe Nr. 5 mit Chips, die einen guten Gehalt an den beiden Substanzen zeigt.**



**Abbildung 4.7. Chromatogramm von Probe Nr. 3 (Kaffee instant Neskafe), die mit einer Standard-Chromatogramm (die gestrichelte Linie) verglichen ist. Die Kaffee-Probe besitzt einen sehr hohen Gehalt an Methylglyoxal 57,5 µg/g) und hohen Gehalt an Glyoxal (12,4 µg/g).**

#### 4.1.4. Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Keksproben

Die Keksproben sind aus vier Typen Kekse, bei der einen Unterschied in der Vorbereitung des Teigs vor dem Backen vorhanden ist. Der Teig für den einen Typ Kekse enthält kein Enzym (Kontrollkekse), sondern Teig für die andere Typen Kekse enthält Enzym in verschiedenen Konzentration, bzw. 500 mg/kg, 700 mg/kg und 900 mg/kg (Tabelle 4.4.).

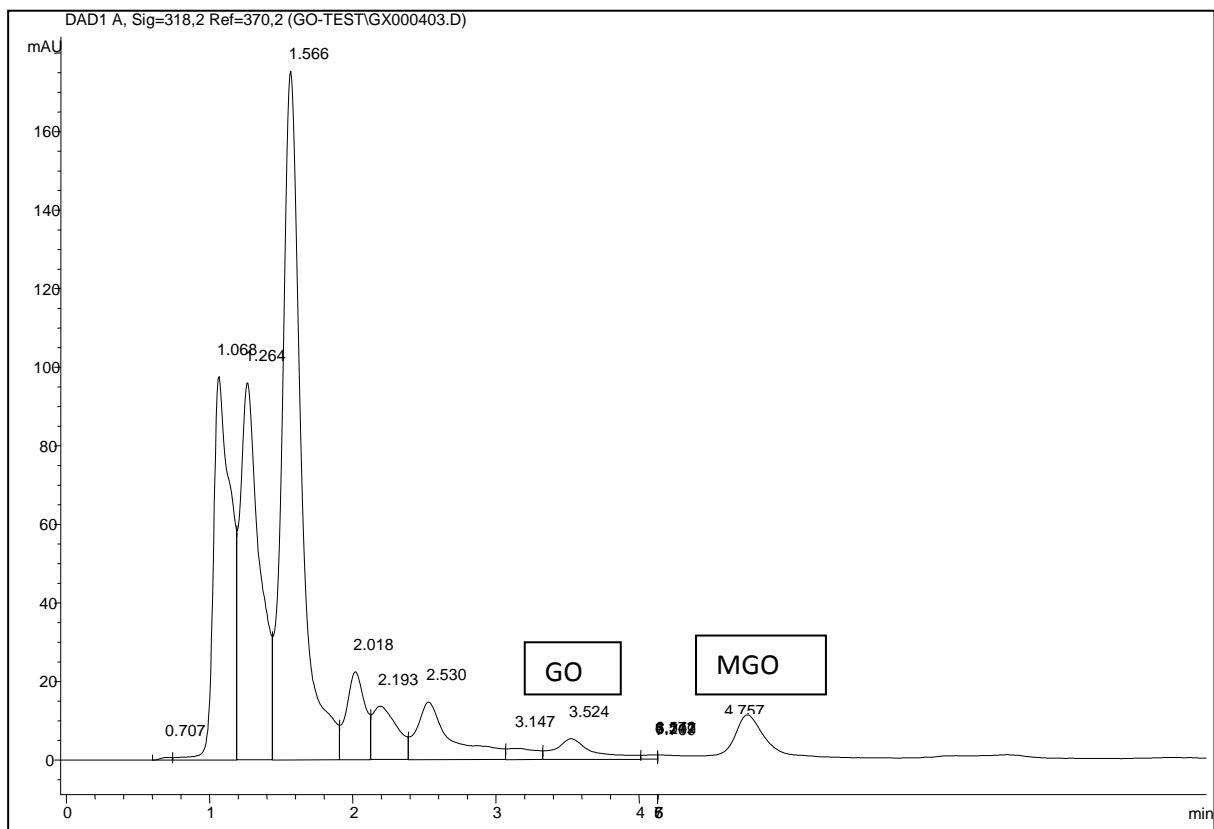
**Tabelle 4.3. Zutaten für den Teig.**

Zutat	Menge, g
Teilhydriertes Öl	48
Salz, Milch (fettfrei), NaHCO <sub>3</sub>	jewels 1,2
Fruktose	50,4
Wasser (deionisiert)	27
NFCS	1,8
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	0,6
Weißmehl	120

**Tabelle 4.4. Konzentration des Glyoxals und Methylglyoxals in den Keksproben.**

Probe nr	Probe (Typ)	Glyoxal Konzentration, µg/g	Methylglyoxal Konzentration, µg/g
1	Kekse ohne Enzym 1	9,2	39,9
2	Kekse ohne Enzym 2	8,9	39,2
3	Kekse ohne Enzym 3	8,8	39
4	Kekse mit Enzym 500 mg/kg 1	9,5	37,4
5	Kekse mit Enzym 500 mg/kg 2	9,2	36,4
6	Kekse mit Enzym 500 mg/kg 3	8,9	36,8
7	Kekse mit Enzym 700 mg/kg 1	9,6	38,8
8	Kekse mit Enzym 700 mg/kg 2	9,8	37,6
9	Kekse mit Enzym 700 mg/kg 3	8,9	38,7
10	Kekse mit Enzym 900 mg/kg 1	9,5	38,5
11	Kekse mit Enzym 900 mg/kg 2	9,1	37,2
12	Kekse mit Enzym 900 mg/kg 3	9,0	38,8

Als Enzym wurde eine Asparaginase (3500 ASNU/g) eingesetzt. In diesem Experiment sollte zeigen, ob bzw. wie sehr sich durch den Einsatz des Enzyms Asparaginase die Bildung von Acrylamid reduzieren lässt (Sindler, 2013). Die Keksprouben zeigen einen hohen Gehalt an Methylglyoxal – von 36 bis 40  $\mu\text{g/g}$  und einen Gehalt an Glyoxal von 8,8 bis knapp 10  $\mu\text{g/g}$ . Die Unterschiede in den ausgewerteten Konzentrationen der beiden Substanzen sind bei den verschiedenen Gruppen Proben vernachlässigt – nur 2-3  $\mu\text{g/g}$  für Methylglyoxal und max. 1  $\mu\text{g/g}$  für das Glyoxal. Die Gruppe von den Keksprouben, die nicht mit Enzym behandelt sind, zeigt 1-2  $\mu\text{g/g}$  höhere Konzentration von Methylglyoxal. Insgesamt zeigen alle Keksprouben sehr ähnliche Werte, die von der Enzym-Vorbehandlung nicht abhängen. Die Retentionszeit für Glyoxal ist 3,5 min und für Methylglyoxal 4,7 min (Abb.4.4.).



**Abbildung 4.8. Chromatogramm einer Keksproube ohne Zugabe der Asparaginase. RT für Glyoxal ist 3,524 min und für Methylglyoxal 4,757 min.**



## 4.2. Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal in Mausblutserum

### 4.2.1 Validierung

Die Validierung wird nach der oben beschriebenen Methode zur Bestimmung von Glyoxal und Methylglyoxal in Blutserum gemacht (s. 3.2.2.). Zur Validierung der Methode wurde Blutserum von Rind verwendet.

Die Validierung zeigt gute definierte Peaks und größere Oberfläche (Area) der Peaks bei einer Derivatisierungszeit von 24 h als bei 8 h Derivatisierung. Eine Derivatisierungszeit von 32 oder 48 h ist zu lang und außerdem kann die Stabilität der Proben problematisch sein. Darum wurde zur Analyse des Blutserums eine Derivatisierungszeit von 24 h ausgewählt.

Bei der Probenvorbereitung ist die Zeit der Zugabe von Acetonitril zu dem Blutserum unterschiedlich. Die Resultate zeigen, dass die Zeit der Zugabe nicht von Bedeutung ist.

### 4.2.2. Kalibration

Wegen eines zu hohen Rückdrucks der HPLC-Säule wurde die Kalibration bei zwei verschiedenen Flussraten (0,6 ml/min und 0,45 ml/min) durchgeführt. Es wurden auch die Blutserum-Proben bei den beiden Flussraten gemessen.

#### *Analytische RP-HPLC:*

Säule: Phenomenex Gemini® 3 µm C18 110 Å, LC Column 150 × 3 mm

Säulentemperatur: 25 °C

Injektionsvolumen: 10 µl

**Flussrate 1: 0,6 ml/min;**

**Flussrate 2: 0,450 ml/min**

Wellenlänge: 318 nm

Elution: 50 % Fließmittel A und 50 % Fließmittel B

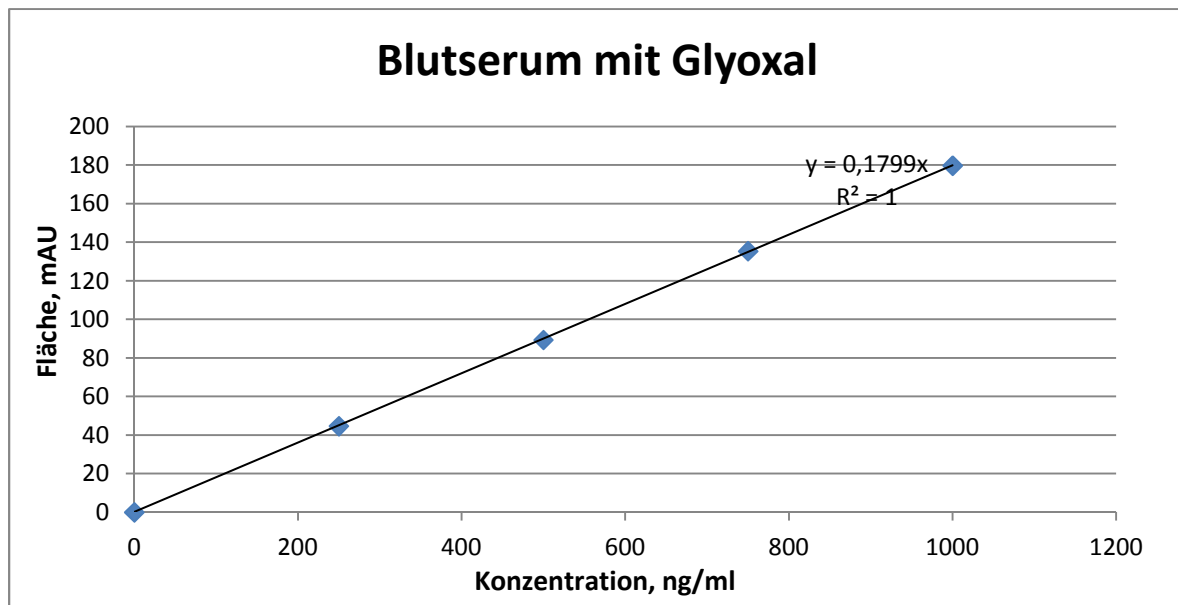
Fließmittel A: 0,075 % Essigsäure in Wasser; Fließmittel B: Methanol (HPLC-Qualität)

Die Messung der Standardproben für die Kalibration bei Flussrate 0,6 ml/min sind in der Tabelle 4.2. vorgestellt:

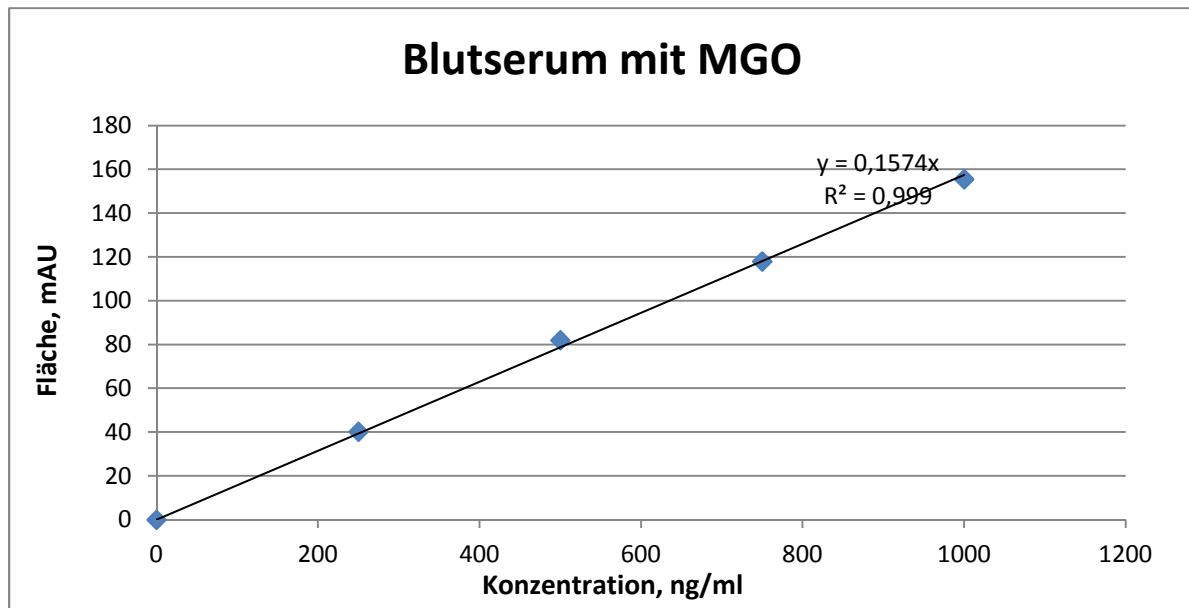
**Tabelle 4.5. Standard-Kalibration. Messung bei 0,6 ml/min.**

Glyoxal	Blutserum+GO	Methylglyoxal	Blutserum+MGO
Konzentration, ng/ml	Area, mAU	Konzentration,ng/ml	Area, mAU
0	0	0	0
250	44,7	250	40,2
500	89,4	500	82
750	135,4	750	118
1000	179,8	1000	155,6

Die erstellten Kalibrationsgeraden für Glyoxal- und Methylglyoxal-Standardproben zusammen mit Blutserum geben die erforderliche Grundlage für die Auswertung der Konzentrationen von Glyoxal und Methylglyoxal in den Blutserumproben. Sie zeigen eine gute Korrelation (Abb. 4.4. und 4.5.).



**Abbildung 4.9. Kalibrationsgerade für das Methylglyoxal plus Blutserum. Messung bei Flussrate 0,6 ml/min.**



**Abbildung 4.10. Kalibrationsgerade für das Methylglyoxal plus Blutserum. Messung bei Flussrate 0,6 ml/min.**

Die Messung der Standardproben für die Kalibration bei Flussrate 0,45 ml/min sind in der Tabelle 4.3. dargestellt.

**Tabelle 4.6. Standard-Kalibration. Messung bei 0,45 ml/min.**

Glyoxal	Blutserum+GO	Methylglyoxal	Blutserum+MGO
Konzentration, ng/ml	Area, mAU	Konzentration, ng/ml	Area, mAU
0	0	0	0
250	17	250	12,8
500	34,1	500	26
750	51,2	750	39
1000	68	1000	51,5

Die erstellten Kalibrationsgeraden sind sehr gut definiert. Sie zeigen eine gute definierte Abhängigkeit der Oberfläche von den entsprechenden Konzentrationen (Abb. 4.7. und 4.8.).

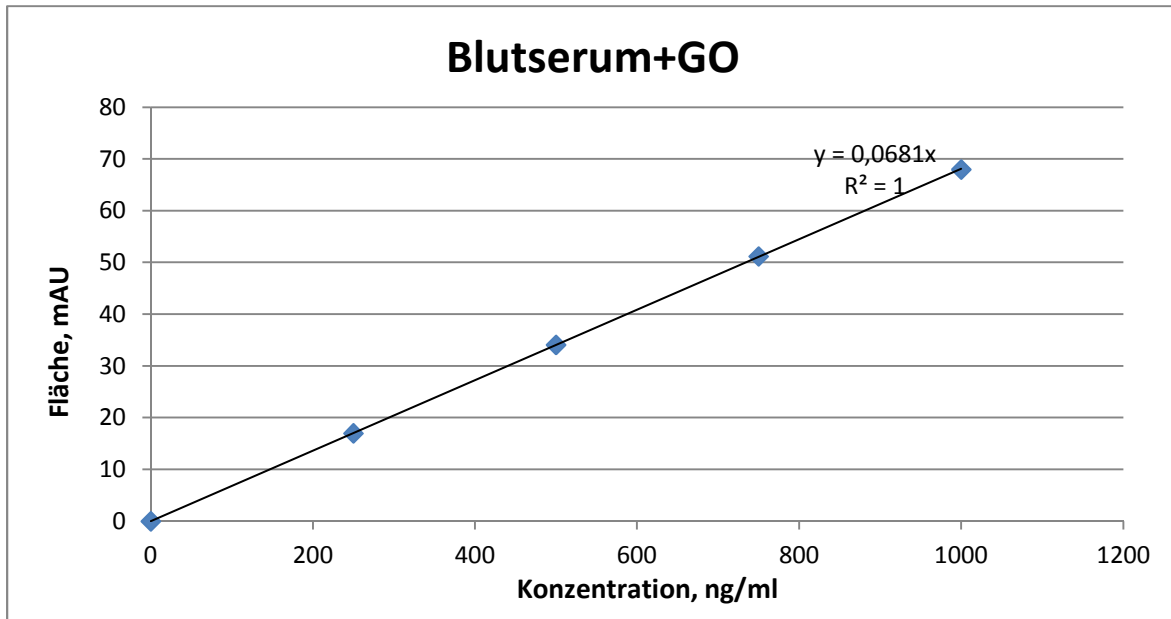


Abbildung 4.11. Kalibrationsgerade für das Glyoxal plus Blutserum. Messung bei Flussrate 0,450 ml/min.

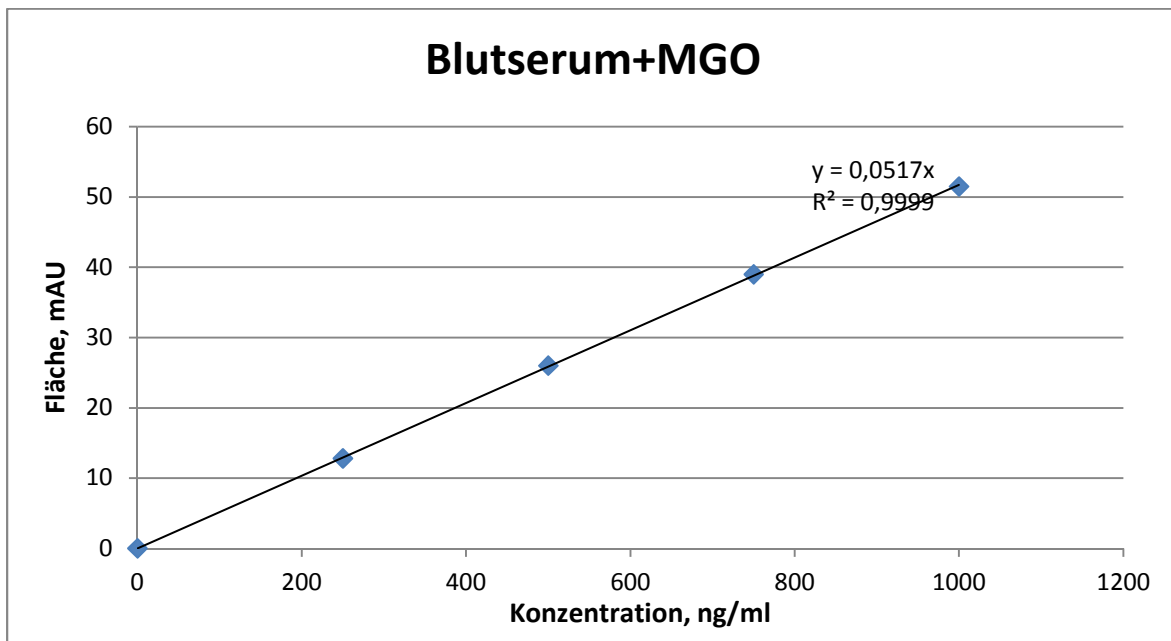
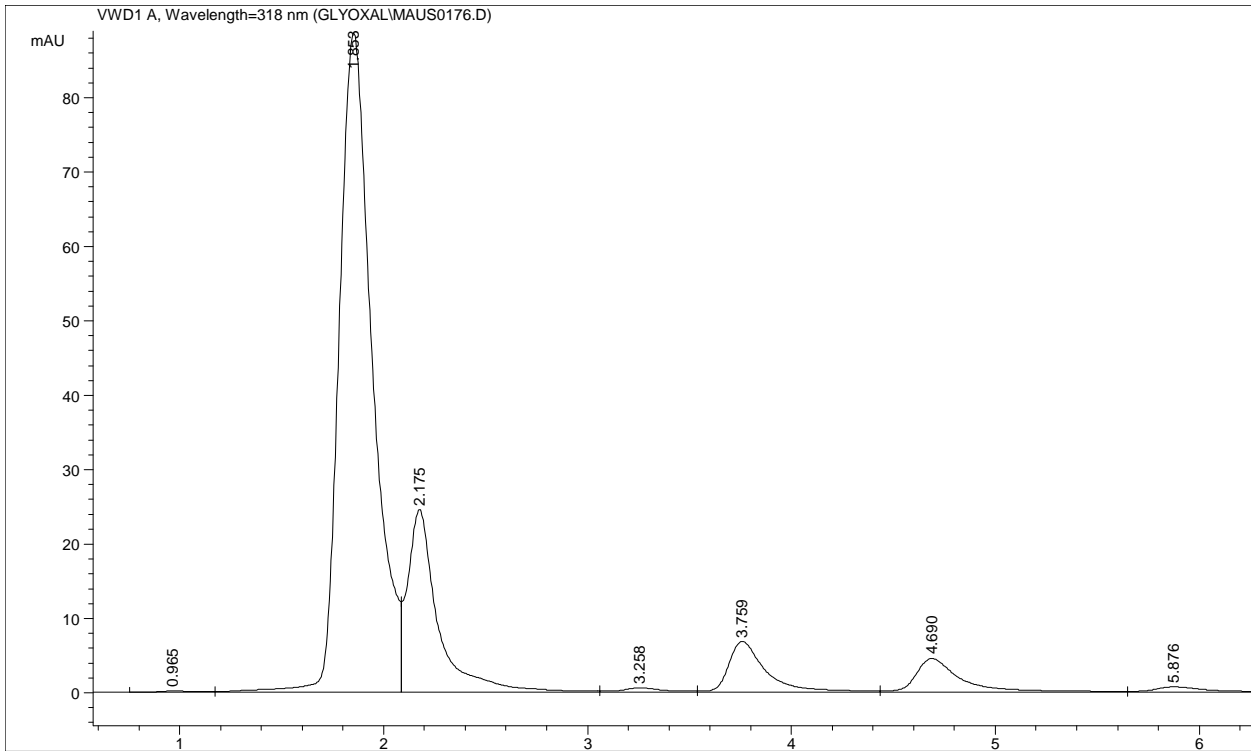


Abbildung 4.12. Kalibrationsgerade für das Methylglyoxal plus Blutserum. Messung bei Flussrate 0,450 ml/min.

Die Retention Zeit bei Flussrate 0,6 ml/min ist für das Glyoxal 7,1 und für das Methylglyoxal – 8,9 (Abb. 4.9.) und bei 0,450 ml/min für Glyoxal ist 4,0\_ bzw. für Methylglyoxal – 5,0\_.



**Abbildung 4.13. Chromatogramm eines Standardgemisches mit einer Konzentration von jeweils 1µg/ml. RT für Glyoxal ist 3,759 min, für Methylglyoxal ist 4,690 min. Messung bei 0,450 ml/min Flussrate.**

#### **4.2.3. Bestimmung der Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal in Blutserum-Proben**

Die Proben mit Blutserum sind von *National Institute of Public Health, Oslo/Norwegen* zur Analyse überlassen. Die überlassene Information über die Proben, die Behandlung und Diät der Mäuse, die als Quelle des Blutserums dienen, ist folgende:

*46 weibliche Mäuse C57BL/6J Wildtyp (wt) wurden jeweils zu zweit einem Käfig untergebracht und mit dem C57BL/6J multiple intestinale Neoplasien (Min) Männlichen gepaart, die zwei mögliche Genotypen bei den Nachkommen, wt oder Min erbringt. Die schwangeren Mäuse wurden verschiedenen Konzentrationen von Glyoxal durch Trinkwasser (0,1 %, 0,05 %, 0,025 % und 0,0125 %) oder durch nicht-dotiertes Wasser (Kontrollgruppe) ausgesetzt. Die Würfe wurden von den Muttertieren am Tag 21 getrennt, und die Weiblichen und Männlichen wurden getrennt in Käfige untergebracht. Die Nachkommen erhalten die gleiche Behandlung, wie vor der Trennung von der Mutter. Eine Gruppe, die regelmäßig Leitungswasser vor dem Absetzen erhielt, dann erhielten 0,1 % Glyoxal-Wasser nach dem Absetzen.*

*Ohr-Knorpel wurde für die Genotypisierung von den Würfen verwendet. Die Lösungen wurden nach mindestens 14 Tagen gewechselt. Wasser und Futter wurden nach Wunsch gegeben und die Aufnahme wurde wöchentlich kontrolliert. Die Tiere wurden in Kunststoffkäfigen mit einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Zyklus untergebracht. Die Min-Mäuse wurden im Alter von zehn Wochen getötet, um die Zahl der Darm-Tumoren zu bestimmen. Die WT-Mäuse wurden verwendet, um die interne Dosis von Glyoxal zu beurteilen; sie wurden entweder fünf oder zehn Wochen Älter untersucht.*

Die gemessenen und ausgewerteten Konzentrationen von Glyoxal und Methylglyoxal in den Blutserum-Proben sind in der folgenden Tabelle gezeigt:

**Tabelle 4.7. Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal in den gemessenen Proben Blutserum.**

<b>Maus nr</b>	<b>ID</b>	<b>Sex</b>	<b>Genotype</b>	<b>Behandling</b>	<b>5 or 10 weeks old</b>	<b>Glyoxal (ng/ml)</b>	<b>MGO (ng/ml)</b>
724	GlyMin7.1M1	Male	wt	control (tap water)	10w	41	108
738	GlyMin13.1M2	Male	wt	control (tap water)	10w	49	180
771	GlyMin19.1M3	Male	wt	control (tap water)	10w	18	97
743	GlyMin13.1F4	F	wt	control (tap water)	10w	34	116
775	GlyMin19.1F1	F	wt	control (tap water)	10w	24	81
810	GlyMin25.1F1	F	wt	control (tap water)	10w	162	91
728	GlyMin8.1M1	Male	wt	0.1% glyoxal	10w	26	132
751	GlyMin14.1M7	Male	wt	0.1% glyoxal	10w	59	170
868	GlyMin2.1M2	Male	wt	0.1% glyoxal	10w	46	61
752	GlyMin14.1F1	F	wt	0.1% glyoxal	10w	32	77
816	GlyMin26.1F1	F	wt	0.1% glyoxal	10w	34	103
872	GlyMin2.1F1	F	wt	0.1% glyoxal	10w	0	43
718	GlyMin3.1M1	Male	wt	0.05% glyoxal	10w	69	445
818	GlyMin27.1M1	Male	wt	0.05% glyoxal	10w	29	118
911	GlyMin9.1M1	Male	wt	0.05% glyoxal	10w	38	79
719	GlyMin3.1F1	F	wt	0.05% glyoxal	10w	35	126
757	GlyMin15.1F2	F	wt	0.05% glyoxal	10w	25	106
831	GlyMin33.1F3	F	wt	0.05% glyoxal	10w	61	64
792	GlyMin23.1M2	Male	wt	0.025% glyoxal	10w	67	52
836	GlyMin35.1M1	Male	wt	0.025% glyoxal	10w	35	120
919	GlyMin11.1M1	Male	wt	0.025% glyoxal	10w	50	45
838	GlyMin35.1F1	F	wt	0.025% glyoxal	10w	120	112
891	GlyMin5.1F1	F	wt	0.025% glyoxal	10w	0	34
921	GlyMin11.1F1	F	wt	0.025% glyoxal	10w	37	43

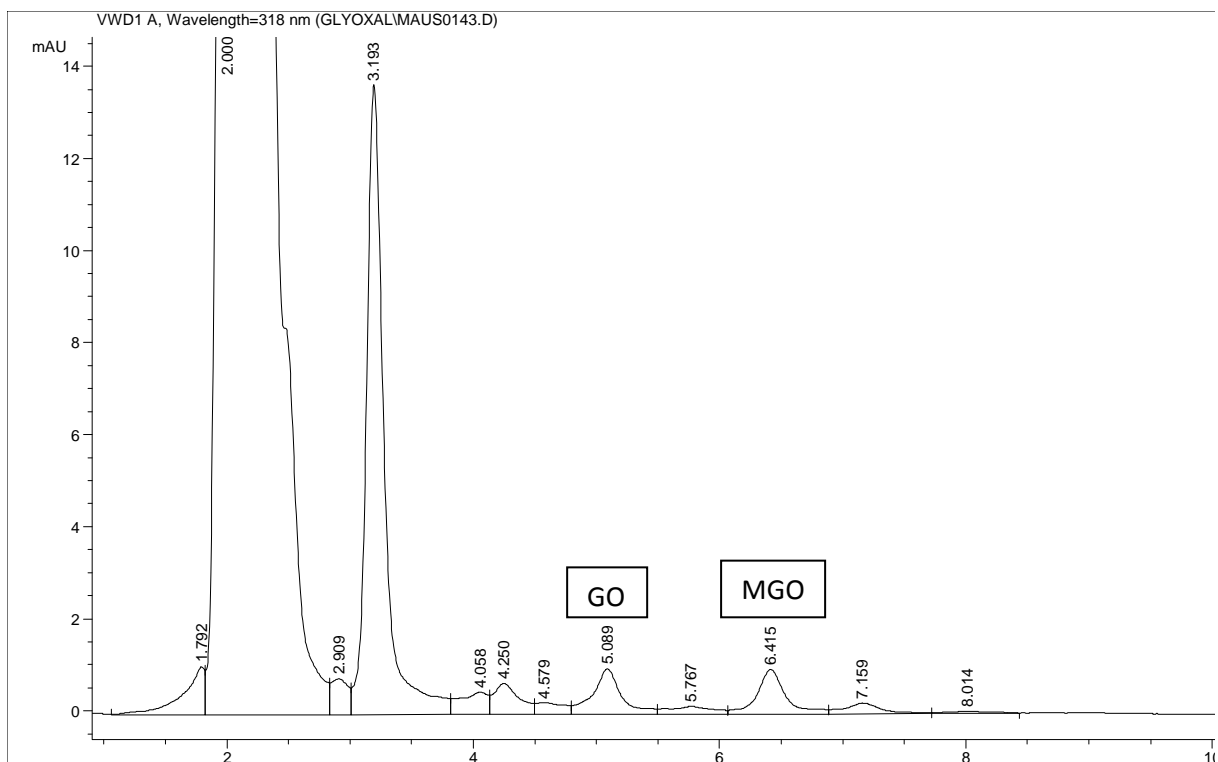
<b>798</b>	<b>GlyMin24.1M2</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	10w	37	159
<b>847</b>	<b>GlyMin12.1M2</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	10w	n.q.	34
<b>896</b>	<b>GlyMin6.1M2</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	10w	28	64
<b>801</b>	<b>GlyMin24.1F1</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	10w	n.q.	0
<b>856</b>	<b>GlyMin12.1F2</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	10w	45	56
<b>901</b>	<b>GlyMin6.1F1</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	10w	0	48
<b>759</b>	<b>GlyMin16.1M2</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	41	166
<b>835</b>	<b>GlyMin34.1M2</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	69	98
<b>881</b>	<b>GlyMin4.1M1</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	71	38
<b>761</b>	<b>GlyMin16.1F1</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	31	147
<b>789</b>	<b>GlyMin22.1F1</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	40	153
<b>884</b>	<b>GlyMin4.1F1</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	10w	0	38
<b>1047</b>	<b>GlyMin22.2M2</b>	Male	wt	control (tap water)	5w	33	38
<b>1053</b>	<b>GlyMin22.2M8</b>	Male	wt	control (tap water)	5w	64	39
<b>1124</b>	<b>GlyMin28.1M1</b>	Male	wt	control (tap water)	5w	54	60
<b>1056</b>	<b>GlyMin22.2F3</b>	F	wt	control (tap water)	5w	0	0
<b>1057</b>	<b>GlyMin22.2F4</b>	F	wt	control (tap water)	5w	0	47
<b>1126</b>	<b>GlyMin28.1F2</b>	F	wt	control (tap water)	5w	34	45
<b>956</b>	<b>GlyMin3.2M5</b>	Male	wt	0.1% glyoxal	5w	40	116
<b>988</b>	<b>GlyMin13.2M3</b>	Male	wt	0.1% glyoxal	5w	44	128
<b>1063</b>	<b>GlyMin23.2M6</b>	Male	wt	0.1% glyoxal	5w	45	58
<b>958</b>	<b>GlyMin3.2F2</b>	F	wt	0.1% glyoxal	5w	109	101
<b>990</b>	<b>GlyMin13.2F1</b>	F	wt	0.1% glyoxal	5w	75	0
<b>1072</b>	<b>GlyMin23.2F7</b>	F	wt	0.1% glyoxal	5w	22	62



<b>929</b>	<b>GlyMin41.1M1</b>	Male	wt	0.05% glyoxal	5w	n.q.	0
<b>972</b>	<b>GlyMin8.2M5</b>	Male	wt	0.05% glyoxal	5w	46	105
<b>996</b>	<b>GlyMin14.2M3</b>	Male	wt	0.05% glyoxal	5w	67	65
<b>937</b>	<b>GlyMin41.1F3</b>	F	wt	0.05% glyoxal	5w	51	42
<b>949</b>	<b>GlyMin21.1F1</b>	F	wt	0.05% glyoxal	5w	61	45
<b>975</b>	<b>GlyMin8.2F2</b>	F	wt	0.05% glyoxal	5w	223	1644
<b>927</b>	<b>GlyMin40.1M2</b>	Male	wt	0.025% glyoxal	5w	0	122
<b>1019</b>	<b>GlyMin16.2M3</b>	Male	wt	0.025% glyoxal	5w	60	41
<b>1094</b>	<b>GlyMin26.2M1</b>	Male	wt	0.025% glyoxal	5w	28	36
<b>984</b>	<b>GlyMin10.2F1</b>	F	wt	0.025% glyoxal	5w	54	66
<b>1023</b>	<b>GlyMin16.2F4</b>	F	wt	0.025% glyoxal	5w	57	147
<b>1080</b>	<b>GlyMin24.2F2</b>	F	wt	0.025% glyoxal	5w	0	37
<b>1005</b>	<b>GlyMin15.2M4</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	5w	46	114
<b>1027</b>	<b>GlyMin37.1M3</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	5w	n.q.	15
<b>1098</b>	<b>GlyMin27.2M2</b>	Male	wt	0.0125% glyoxal	5w	81	43
<b>1117</b>	<b>GlyMin35.2F1</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	5w	0	42
<b>1012</b>	<b>GlyMin15.2F2</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	5w	26	114
<b>1014</b>	<b>GlyMin15.2F4</b>	F	wt	0.0125% glyoxal	5w	33	52
<b>942</b>	<b>GlyMin43.1M1</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	61	62
<b>963</b>	<b>GlyMin7.2M5</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	145	112
<b>1082</b>	<b>GlyMin25.2M1</b>	Male	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	39	38
<b>967</b>	<b>GlyMin7.2F3</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	65	53
<b>1088</b>	<b>GlyMin25.2F3</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	72	39
<b>1121</b>	<b>GlyMin31.1F2</b>	F	wt	Before weaning:tap water, after weaning:0.1% glyoxal	5w	37	50

Die gemessenen Konzentrationen für Glyoxal und Methylglyoxal zeigen individuelle Unterschiede zwischen den Blutserum-Proben innerhalb jeder Gruppe, die aus gleich behandelten Tieren gewonnen sind. Aber diese Unterschiede sind nicht relevant, mit einigen Ausnahmen. Insgesamt – mit wenigen Ausnahmen – ist die Konzentration von Methylglyoxal höher als diese des Glyoxals.

Eine detaillierte statistische Auswertung der Ergebnisse durch die Kooperationspartner steht noch aus. Auf den ersten Blick kann man zwischen den einzelnen Gruppen keinen Unterschied erkennen.<sup>6</sup> Die Glyoxal-Exposition hatte nicht zu einer Erhöhung von der Anzahl oder der Größe der intestinalen Tumoren geführt.



**Abbildung 4.14. Chromatogramm der Serum Probe 975, die eine extrem hohe Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal aufweist.**

<sup>6</sup> Persönliche Mitteilung, Camilla Svendsen, National Institute of Public Health, Oslo, Norwegen

## 5. Diskussion

### 5.1. Lebensmittel

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurde das Vorhandensein des Glyoxals und Methylglyoxals in den Lebensmittelprodukten entdeckt, die typischerweise einen hohen Gehalt an Maillardprodukten aufweisen. Die Gruppe der Kaffeeprodukte und diese der Backwaren, sowie manche Proben aus tierischer Herkunft, zeigen logischerweise hohe bzw. relativ hohe Konzentrationen der untersuchten Substanzen. Insgesamt ist der Gehalt an Methylglyoxal in allen gemessenen Proben höher als an Glyoxal. Einen extrem hohen Gehalt an Methylglyoxal wurde in einigen Kaffeeproben gefunden. Neben den Kaffeeproben finden sich Glyoxal und Methylglyoxal in relativ hohen Konzentrationen in diverse Backwaren, wie Salzstangen, Kekse, Knäckebröte, Chips und in einige tierischen Produkten, wie Ziegenkäse und Kaviar. Für diese Lebensmittelprodukte ist der Verlauf der Maillardreaktion als Resultat der thermischen Behandlung (Rösten, Braten, Backen) typisch und die angegebene Ergebnisse sind zu erwarten. Die Konzentrationen der beiden Dicarbonylverbindungen liegen in der Regel unter der Toxizitätsgrenze. Toxische Effekte – ausgehend von in Lebensmitteln vorkommenden Gehalten an MGO – sind also nicht zu erwarten.

Das Enzym Asparaginase, mit dem der Kekse-Teig vorbehandelt ist, spielt keine Rolle für die Konzentration von Glyoxal und Methylglyoxal in den Keksen. Die beiden Substanzen wurden in diesem Fall nur zusätzlich untersucht. Bei diesem Experiment sollte die Wirkung der Asparaginase auf die Bildung von Acrylamid untersucht werden. Die Bildung von GO und MGO könnte durch eine veränderte Aminosäurezusammensetzung verändert werden. Es hat sich aber gezeigt, dass ein Einfluss – wenn überhaupt vorhanden – in diesem Experiment nicht nachgewiesen werden konnte. Die Kontroll-Kekse (ohne Enzym) wurden mit den anderen Keksprouben, dessen Teig Asparaginase in verschiedenen Konzentrationen enthielt, verglichen und es konnte kein Unterschied gemessen werden. Wie die anderen Backwaren wurden die Kekse (mit und ohne Asparaginase) findet sich hier ein sehr hohen Gehalt an Methylglyoxal und ein relativ hohen Gehalt an Glyoxal. Wieder sind die gemessenen Werte für Methylglyoxal höher als diese des Glyoxals. Die Bildung von Methylglyoxal kann man nicht nur durch Maillard-Reaktion, sondern durch die anderen Wege, wie die Lipidperoxidation, bzw. die Glykolyse erklärt werden.

## 5.2. Blutserum

Insgesamt ist der Gehalt an Methylglyoxal im Blutserum höher als dieser des Methylglyoxals, trotzdem die Mäuse nur Glyoxal oral aufgenommen haben. Die Ursache dafür kann man die Bildung des Methylglyoxals aus der Lipidoxidation, der Glykolyse, oder dem Threoninstoffwechsel sein. Die gemessenen Konzentrationen von Methylglyoxal und Glyoxal im Blutserum der Mäuse sind geringer als die gefährlichen Werte und sie stellen kein Risiko aus der Sicht der Bildung von intestinalen Tumoren vor.

Die Glyoxal-Exposition zeigte auch keine Erhöhung der Anzahl oder der Größe der intestinalen Tumoren<sup>7</sup>. Dies kann man aufgrund der Tatsache erläutern, dass das Glyoxal nicht intestinal krebserzeugend ist, oder es wurde schnell von dem Glyoxalase-System entgiftet. Das Glyoxal kann zu einem Gesundheitsrisiko führen, wenn die Glyoxalase-Enzyme gesättigt sind, was im Fall von unbehandeltem Diabetes passieren kann. Es wäre interessant, die Folgen einer längeren Einwirkung von Glyoxal auf diabetische Mäusen zu untersuchen.

Bei den WT-Mäusen gab es keine Unterschiede zwischen den exponierten Gruppen und der Glyoxalkonzentration im Serum. Die Messung von Glyoxal im Serum könnte eine schwierige Aufgabe wegen der hohen Reaktivität der Verbindung sein. Im Nachhinein würde Messung CML als Biomarker für Glyoxal eine bessere Option sein, da es stabiler als Glyoxal ist.

---

<sup>7</sup> Persönliche Mitteilung von Camilla Svendsen; National Institute of Public Health, Oslo, Norwegen

# Abkürzungsverzeichnis

ACN – Acetonitril

AGEs - Advanced Glycation Endprodukts (Glykosilierungsendprodukten)

ASN - Asparaginase

CEL - Carboxyethyllysin

CMA -  $N_{\omega}$ -Carboxymethylarginin

CMDG -  $N_2$ -Carboxymethyl-deoxyguanosin

CML – Carboxymethyllysin

dG – Deoxyguanosine

DNPH - 2,4-Dinitrophenylhydrazine

DOLD - 3-deoxyglucosone lysine dimer

GDC - 5-Glycolyl-deoxycytidine

G-H1 -  $N_{\delta}$ -(5-hydro-4-imidazol-2-yl)ornithine

Glo 1 – Glyoxalase 1

GO – Glyoxal

GOLD - glyoxal lysine dimer

HPLC – high performance liquid chromatographie (Hochleistungsflüssigkeitschromatografie)

MG-H1 -  $N_{\delta}$ -(5-hydro-5-methyl-4-imidazol-2-yl)-ornithine

MGO – Methylglyoxal

MOLD - methylglyoxal lysine dimer

NP – Normal phase (Normalphase)

OPD – ortho-Phenylendiamin

PD – Peritoneal Dialysat

RP – Reversed Phase (Umkehrphase)

RT – Retention Time (Retention Zeit)

3-DG - 3-Desoxyglucosulose

# Literaturverzeichnis

Angrick M., Rewicki D., *Chemie in unserer Zeit*, **5**, 149-156 (1980)

Atrott J., Haberlau S., Henle T. Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydr. Res.* 2012

Atrott J., Henle T., Methylglyoxal in Manuka Honey – Correlation with Antibacterial Properties. *Czech J. Food Sci.* Vol. 27, 2009.

Beisswenger P.J., Howell S., Touchette A., Lal S., Szwegold B.S. Metformin reduces systemic methylglyoxal levels in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999; 48:198–202.

Bierhaus A., Fleming T., Stoyanov S., Leffler A., Babes A., Neacsu C., Sauer S.K., Eberhardt M., Schnölzer M., Lasitschka F., Neuhuber W.L., Kichko T.I., Konrade I., Elvert R., Mier W., Pirags V., Lukic I.K., Morcos M., Dehmer T., Rabbani N., Thornalley P.J., Edelstein D., Nau C., Forbes J., Humpert P.M., Schwaninger M., Ziegler D., Stern D.M., Cooper M.E., Haberkorn U., Brownlee M., Reeh P.W., Nawroth P.P. Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature Med.* 2012, 18, 926–933

Brands C.M., van Boekel, M.A. Reactions of monosaccharides during heating of sugar-casein systems: building of a reaction network model. *J. Agric. Food Chem.* 2001, **49(10)**, 4667-4675

Conroy P.J.: Ciba Found Symp. 1978; (67):271-300

De Revel G., Bertrand A. A method for the detection of carbonyl compounds in wine: glyoxal and methylglyoxal. *J. Sci. Food Agric.* 1993, 267-271.

Dobler D., Ahmed N., Song L.J., Eboigbodin K.E., Thornalley P.J. Increased dicarbonyl metabolism in endothelial cells in hyperglycemia induces anoikis and impairs angiogenesis by RGD and GFOGER motif modification. *Diabetes*. 2006; 55:1961–1969.

Dwyer\* T.J., Fillo J.D. Assaying  $\alpha$ -Dicarbonyl Compounds in Wine: A Complementary GC–MS, HPLC, and Visible Spectrophotometric Analysis, *Journal of Chemical Education* 2006 Vol. 83 No. 2

Eichner K.: in: Autoxidation in Food and Biological Systems (Simic, M.G., Karel, M.; Hrsg.), *Plenum Press 1980*, New York, 367-385

Espinosa-Mansilla A., Duran-Meras I., Salinas F. High-Performance Liquid Chromatographic–Fluorometric Determination of Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl in Urine by Prederivatization to Pteridinic Rings. *Analytical Biochemistry* 1998, 255, 263–273

Frandrup-Kuhr O., Dissertation: Einfluss der Reaktionswege der Maillard-Reaktion von Pentosen auf die Bildung heterocyclischer aromatischer Amine, 2004, Münster

Glomb M.A., Lang G. Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* 1997, **49**, 1493-1501

Hayashi T., Shibamoto T. Analysis of Methyl Glyoxal in Foods and Beverages *J. Agric. Food Chem.* 1985, 33, 1090-1093

Henle T. Der süße Bakter. *Labor&More* 02/07, 50-51

Hodge J.E. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 1953, **1**, 928-943

Inoue Y., Kimura A. Methylglyoxal and regulation of its metabolism in microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.* 1995, **37**:177–227

Kasai H., Kumeno K., Yamaizumi Z., Nishimura S., Nagao M., Fujita Y., Sugimura T., Nukaya H., Kosuge T., Mutagenicity of methylglyoxal in coffee. *Gann.* 1982, 73(5):681-683



Lindenmeier M., Faist V., Hofmann T.: Structural and Functional Characterization of Pronyl-lysine, *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50, 6997–7006.

Maillard L.C.: *Comptes rendus*, 154, 66-68 (1912)

Mavric E. Dissertation: Argininderivatisierung und 1,2-Dicarbonylverbindungen in Lebensmitteln 2006, Technische Universität Dresden

Mavric E., Wittmann S., Barth G., Henle T. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. *Mol Nutr Food Res.* 2008 Apr; 52(4):483-9.

McCooc J.P., Gordon P.J., Woodward C., Sunless tanning products and processes. *Concept Laboratories*, 2012, US 8182793 B2

McLellan A.C.; Phillips S.A., Thornalley P.J. The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene. *Anal. Biochem.* 1992, 206, 17-23

Meerwaldt R., Links T., Zeebregts C., Tio R., Hillebrands J.L., Smit A. The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2008, 7:29

Nagao M., Fujita Y., Wakabayashi K., K. Mutagens in coffee and other beverages, *Environ. Health Perspectives* 1986, 67, 89-91

Nakajima K., Ohta K., Mostefaoui T.A., Chai W., Utsukihara T., Horiuchi C.A., Masahiko Murakami M. Glyoxal sample preparation for high-performance liquid chromatographic detection of 2,4-dinitro-phenylhydrazone derivative: Suppression of polymerization and mono-derivative formation by using methanol medium. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1161 338–341

Nilsson-Thorell C., Muscalu N., Andrén A., Kjellstrand P., Wieslander A. Heat sterilization of fluids for peritoneal dialysis gives rise to aldehydes. *Peritoneal Dialysis International* 1993, 13, 208-213

Ohmori S., Mori M., Shiraha K., Kawase M. In *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 2*; Weiner H., Flynn T. G., Eds.; A. R. Liss: New York, 1989; p 398.

Okabe E., Tadashi, T., Kazuhito T., Hiroshi K., Jyun-ichi K., Masaru N. Synergistic cytotoxicity of acidity and glucose degradations products in peritoneal dialysis fluid. *J. Artif. Organs* 2004, **7**, 155-160

Ronzio A. R., Waugh T. D. Glyoxal Bisulfite. *Org. Synth.* 1944, **24**: 61; *Coll. Vol.* 3: 438

Schwartz E., Manthei R.W. Enhanced Methylglyoxal Toxicity in Oxythiamine Induced Thiamine Deficiency in Mice. *Exp Biol Med* (Maywood) August 1964, vol. 116 no. 4 1089-1091

Sindler W. Masterarbeit: Strategien zur Minimierung der Acrylamidbildung. 2012, Technische Universität Graz

Strzinek R.A., Scholes V.E., Norton S.J., Purification and Characterization of Liver Glyoxalase-I from Normal Mice and from Mice Bearing A Lymphosarcoma. *Cancer Res.* 1972; **32**:2359–2364.

Szent-Gyorgyi A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1977, **74**, 2847.

Thornalley P.J. Glyoxalase I - structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem. Soc. Trans.* 2003, **31** (Pt 6): 1343–8.

Thornalley P.J., Langborg A., Minhas H. S. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 1999, **344**, 109-116

Thornalley P.J. Protein and nucleotide damage by glyoxal and methylglyoxal in physiological systems - role in ageing and disease. *Drug Metabol.* 2008; **23** (1-2) : 125-150.

Yamaguchi M., Ishida J., Xuan-Xuan Z., Nakamura M., Yoshitake T. Determination of glyoxal, methylglyoxal and diacetyl and 2,3-pentanedione in fermented foods by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chrom.* 1994, 203-211.

Van der Jagt D.L. Glyoxalase II: molecular characteristics, kinetics and mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 1993, 21 (2): 522–7

Weenen H. Reactive intermediates and carbohydrate fragmentation in Maillard chemistry. *Food Chem.* 1998, 62, 393-401

Weigel K.U. Dissertation:  $\alpha$ -Dicarbonyle in Lebensmitteln und glucosehaltigen Lösungen der Peritonealdialyse 2004, Technische Universität Dresden

Wells-Knecht K.J., Zyzak D.V., Lichtfield J.E., Thorpe S., Baynes J.W. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochem.*, 1995, 34, 3702-3709

Wieslander A.P., Andrén A.H., Nilsson-Thorell, C., Muscalu, N., Kjellstrand P.T., Rippe, B. Are aldehydes in heat-sterilized peritoneal dialysis fluids toxic in vitro. *Perit. Dial. Int.* 1995, 15(8), 348-352

Zardari L.A., Khuhawar M.Y., Laghari A.J. Capillary GC Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal in the Serum and Urine of Diabetic Patients After Use of 2,3-Diamino-2,3-dimethylbutane as Derivatizing Reagent, *Chromatographia* 2009, 70, 891-897.

[http://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL\\_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE\\_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew177-K.pdf](http://www.bgrci.de/fileadmin/BGRCI/Downloads/DL_Praevention/Fachwissen/Gefahrstoffe/TOXIKOLOGISCHE_BEWERTUNGEN/Bewertungen/ToxBew177-K.pdf)

<http://de.wikipedia.org/wiki/Glyoxal>

<http://honig-analyse.de>

<http://www.umweltlabor.de/Labor/hplc.htm#1>. Informationen über die HPLC:

<http://web.guideonline.com>

