

Synthese, Charakterisierung und Nachweis neuartiger
Maillard-Proteinmodifikationen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der

Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Michael Dominik Eggen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Marcus A. Glomb

2. Prof. Dr. Thomas Henle

Datum der Abgabe: 21.04.2023

Datum der Verteidigung: 30.08.2023

Vorwort

Die praktischen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Arbeitskreis für Lebensmittelchemie von Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb am Institut für Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Zeitraum von Juni 2018 – Mai 2022 durchgeführt.

Die Dissertation wurde in kumulativer Form angefertigt und die Ergebnisse in Form von drei Einzelpublikationen in der Fachzeitschrift *Journal of Agricultural and Food Chemistry* veröffentlicht. Die detaillierte Beschreibung der Experimente, Bewertung sowie Diskussion der Ergebnisse erfolgten in den beigefügten Publikationen. Weitere unveröffentlichte Ergebnisse wurden an entsprechenden Stellen ergänzt. Die vorliegende Dissertation dient dazu, die einzelnen Publikationen zusammenzufassen und im Kontext des Titels „Synthese, Charakterisierung und Nachweis neuartiger Advanced Glycation End Products“ wissenschaftlich einzuordnen.

Die entsprechenden Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der instrumentell-analytischen Bestimmungen sind den Einzelpublikationen zu entnehmen. Sofern nicht anders angegeben, wurden in der vorliegenden Arbeit in allen Abbildungen und Tabellen stets der Mittelwert sowie die Schwankungsbreiten der Standardabweichung dargestellt.

Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Marcus A. Glomb für die Bereitstellung des anspruchsvollen und gleichermaßen interessanten Themas sowie für das stetige Interesse am Fortschritt der vorliegenden Dissertation. Vielen Dank für die stets hervorragende Betreuung sowie die Unterstützung bei den Anfertigungen der Publikationen. Daneben gilt ein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Thomas Henle für die Übernahme des Zweitgutachtens der vorliegenden Dissertation.

Darüber hinaus gilt ein Dank den Oberassistenten Christian und Thomas für die exzellente Organisation der Praktika und Seminare sowie die stetige Bereitschaft zum wissenschaftlichen Austausch. Ein besonderer Dank geht an Christian, für die unermüdlichen Reparaturen und Wartungen der analytischen Messgeräte. Daneben danke ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Doktoranden des AK-Glombs für das stets hervorragende Arbeitsklima und das freundschaftliche Miteinander.

Herrn Dr. D. Ströhl und dem NMR-Team danke ich herzlich für die Anfertigung der zahlreichen NMR-Messungen sowie der Diskussionsbereitschaft bei der Interpretation der Spektren. Darüber hinaus danke ich Herrn Dr. Andre Frolov und Frau Dr. Annegret Laub für die Durchführung der HR-MS Messungen. Daneben geht ein Dank an die Arbeitskreise von Prof. Csuk und Prof. Merzweiler sowie insbesondere Andreas für die Bereitstellung von trockenem Lösungsmittel.

Ein Dank geht an Helen, Paul und Hans-Peter, welche im Rahmen ihrer Diplomarbeiten durch ihre tatkräftige Unterstützung einen Baustein zu dieser Dissertation beitrugen. Vielen Dank für Eure Unterstützung bei der Durchführung von zahlreichen Vorversuchen, Synthesearbeiten und das Durchhaltevermögen für das an einigen Stellen vielleicht auch monotone Reproduzieren von Experimenten.

Daneben gilt ein besonderer Dank meinen Eltern sowie Familie für die stetige Unterstützung sowie meinen Freunden für Rücksichtnahme in den Zeiten, in denen ich die Fertigstellung der Dissertation priorisierte.

Zuletzt gilt mein größter Dank Alicia für die großartige Unterstützung in den vergangenen Jahren sowie der Toleranz an den unzähligen Tagen, an denen ich die Arbeit voranstellte.

Publikationsliste

Publikationen

- 08/2022 **Eggen, M. D.;** Merboth, P.; Neukirchner, H.; Glomb, M. A. Lipid Peroxidation Has Major Impact on Malondialdehyde-Derived but Only Minor Influence on Glyoxal and Methylglyoxal-Derived Protein Modifications in Carbohydrate-Rich Foods.
J. Agric. Food Chem. 2022, 70 (33), 10271-10283.
- 12/2021 **Eggen, M. D.;** Glomb, M. A. Analysis of Glyoxal- and Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products during Grilling of Porcine Meat.
J. Agric. Food Chem. 2021, 69 (50), 15374–15383.
- 07/2021 **Eggen, M. D.;** Glomb, M. A. Novel Amidine Protein Cross-Links Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine.
J. Agric. Food Chem. 2021, 69 (28), 7960–7968.
- 05/2020 Baldensperger, T.; **Eggen, M.;** Kappen, J.; Winterhalter, P. R.; Pfirrmann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive analysis of posttranslational protein modifications in aging of subcellular compartments.
Sci. Rep. 2020, 10, p. 7596.
-

Präsentationen

- 08/2021 **Poster:**
Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Einfluss der Bratzeit auf die Bildung von Glyoxal und Methylglyoxal sowie stabiler Advanced Glycation End Products bei der Zubereitung von Hackfleisch.
49. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 30.08-01.09.2021, online.
- 03/2021 **Vortrag:**
Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Bildung von Proteinmodifikationen beim Braten von Fleisch. Arbeitstagung des Regionalverbands Südost der Lebensmittelchemischen Gesellschaft der GDCh, 26.03.2021, online.
-

Gliederung

Vorwort.....	I
Danksagung.....	II
Publikationsliste.....	III
Gliederung.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
2 Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Bildung von Carbonyl-Strukturen innerhalb der Maillard-Reaktion und Lipidperoxidation.....	3
2.1.1 Maillard-Reaktion und die Bildung von 1,2-Dicarbonylen.....	3
2.1.2 Lipidperoxidation und die Bildung von Sekundärprodukten.....	6
2.2 Bildung von Aromakomponenten.....	20
2.3 Bildungswege von Advanced Glycation End Products.....	21
2.3.1 Fragmentierungsreaktionen.....	21
2.3.2 Acylierung durch aktivierte Acyl-Carbonylverbindungen.....	24
2.3.3 Isomerisierungs- und Cyclisierungsreaktionen.....	26
2.4 Bildung von Advanced Lipoxidation End Products.....	29
2.4.1 Bildung von Amid-Proteinmodifikationen.....	29
2.4.2 Proteinmodifikationen durch MDA.....	31
2.4.3 Proteinmodifikationen durch 4-HNE.....	35
2.4.4 Proteinmodifikationen durch 4-ONE.....	36
2.4.5 Proteinmodifikationen durch 4,5-Epoxy-2-alkenale.....	38
2.4.6 Proteinmodifikationen durch 2-Hydroxyalkanale.....	38
2.4.7 Proteinmodifikationen durch Alkanale, 2-Alkenale und 2,4-Alkendienale.....	40
2.5 Proteinquervernetzungen in Lebensmitteln.....	42
2.5.1 Bildung von Isopeptidbindungen durch Transaminierung.....	42
2.5.2 Proteinmodifikationen ausgehend von Dehydroalanin.....	43
3 Zielstellung.....	45
4 Diskussion und Einordnung der Ergebnisse.....	47
4.1 Bildung von AGEs durch das Erhitzen von Schweinefleisch.....	47
4.1.1 Vergleichende Analyse von GO- und MGO-AGEs in gebratenem Schweinefleisch.....	47
4.1.2 Neuartiger Bildungsweg von N ⁶ -Lactoyllysin durch S-Lactoylglutathion in Fleisch.....	53
4.2 Beitrag der Lipidperoxidation zur Proteinmodifikation bei der Zubereitung von Lebensmitteln.....	59

4.2.1 Bildung von GO und MGO durch die Lipidperoxidation von ungesättigten Triglyceriden.....	59
4.2.2 Bildung von MDA-Proteinmodifikationen in Lebensmitteln	64
4.3 Proteinquervernetzung durch die Prozessierung von Lebensmitteln	69
4.3.1 Amidine sind neuartige Advanced Glycation End Products.....	69
4.3.2 Proteinquervernetzungen durch GO, MGO und MDA in Lebensmitteln	75
5 Zusammenfassung.....	81
6 Summary	83
7 Abbildungsverzeichnis.....	85
8 Tabellenverzeichnis	87
9 Literaturverzeichnis	88
10 Einzelpublikationen	119
10.1 Publikation 1 <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2021, 69 (28), 7960–7968	119
10.2 Publikation 2 <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2021, 69 (50), 15374–15383	128
10.3 Publikation 3 <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2022, 70 (33), 10271-10283	138
11 Anhang.....	151
11.1 Supporting information <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2021, 69 (28), 7960–7968	151
11.2 Supporting information <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2021, 69 (50), 15374–15383	157
11.3 Supporting information <i>J. Agric. Food Chem.</i> 2022, 70 (33), 10271-10283.....	163
Lebenslauf.....	X
Eigenständigkeitserklärung.....	XI

Abkürzungsverzeichnis

13-HPODE	13-Hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure
1-DG	1-Desoxyglucoson
2-PPL	2-Pentylpyrrol
2-TBA	2-Thiobarbitursäure
3-DG	3-Desoxyglucoson
3-DG-H1	3-Desoxyglucoson-Hydroimidazon 1
3-DP	3-Desoxypentosen
4-HHE	4-Hydroxyhexenal
4-HNE	4-Hydroxynonenal
4-HPNE	4-Hydroperoxy-2-nonenal
4-Ketoamid	4-Oxo-(N-5-amino-5-carboxypentyl)-nonansäureamid
4-ONE	4-Oxononenal
9-HPODE	9-Hydroperoxy-(10E,12Z)-octadecadiensäure
AGE	Advanced Glycation End Product
ALE	Advanced Lipoxidation End Product
Arg	Arginin
BBP	<i>N</i> ⁶ -[(3-Pent-1-enyl)-4-butylpyridinium]-Lysin
BOC	tert-Butoxycarbonyl
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cbz	Benzyloxycarbonyl
CDI	Carbonyldiimidazol
CEA	<i>N</i> ⁷ -Carboxyethylarginin
CEL	<i>N</i> ⁶ -Carboxyethyllysin
CID	collision induced dissociation
CMA	<i>N</i> ⁷ -Carboxymethylarginin
CML	<i>N</i> ⁶ -Carboxymethyllysin
CoA	Coenzym A
DAN	Diaminonaphtalen
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat

DHP	3,4-Dihydropyran
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
DODIC	<i>3-deoxyglucosone-derived imidazoline crosslink</i>
DOLD	<i>3-deoxyglucosone lysine dimer</i>
EMP-Lysin	<i>N⁶-(5-Ethyl-2-methylpyridinium)-Lysin</i>
EP-decenal	4,5-(E)-Epoxy-2-(E)-decenal
EP-heptenal	4,5-(E)-Epoxy-2-(E)-heptenal
FDP-Lysin	<i>N⁶-(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)-Lysin</i>
FLD	Fluoreszenzdetektion
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
G3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GA	Glykolaldehyd
GALA	<i>N⁶-Glykoyllysin</i>
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit der Massenspektrometrie
G-H3	Glyoxal-Hydroimidazon 3
GLA	<i>glyoxal lysine amidine</i>
GLAP	<i>glyceraldehyde-derived pyridinium</i>
GO	Glyoxal
GODIC	<i>glyoxal-derived imidazoline crosslink</i>
GOFAs	<i>glycerol-bound oxidized fatty acids</i>
GOLA	<i>glyoxal lysine amide</i>
GOLD	<i>glyoxal lysine dimer</i>
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histondeacetylasen
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HHP	<i>N⁶-[(3-Hept-1-enyl)-4-hexylpyridinium]-Lysin</i>
Hippuryl-Lysin	6-Amino-2-[(2-benzamidoacetyl)amino]-hexansäure

HMF	Hydroxymethylfurfural
HNA-Lysin	<i>N⁶-4-hydroxynonanoic acid-lysine</i>
HOP	<i>2-Ammonio-6-[4-(hydroxymethyl)-3-oxidopyridinium-1-yl]-hexanoate</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPLC-DAD	HPLC gekoppelt mit Diodenarray-Detektor
HPLC-FLD	HPLC gekoppelt mit Fluoreszenz-Detektor
HPLC-MS/MS	Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
KO	Kokosfett
LAK2	<i>lactaldehyde-derived lysine dimer</i>
LAL	Lysinoalanin
LAPL	<i>lactaldehyde-derived pyridinium-type lysine adduct</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LOD	limit of detection, Nachweisgrenze
LS	Leinöl
Lys	Lysin
MDA	Malondialdehyd
MDA-Lys	<i>N⁶-Propenal-Lysin</i>
MDA-Lys ₂	<i>N⁶-(1-Amino-3-iminopropen)-Lysin</i>
MDHDC	4-Methyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbaldehyd
meta-DLP	<i>1-(5-amino-5-carboxypentyl)-3-(5-amino-5-carboxypentylamino)pyridinium salt</i>
MG-H1/3	Methylglyoxal-Hydroimidazolone 1/3
MGLA	<i>methylglyoxal lysine amidine</i>
MGO	Methylglyoxal
Min	Minute
MODIC	<i>methylglyoxal-derived imidazoline crosslink</i>
MOLA	<i>methylglyoxal lysine amide</i>
MOLD	<i>methylglyoxal lysine dimer</i>
MP-Lysin	<i>N⁶-(3-Methylpyridinium)-Lysin</i>
n.b.	nicht bestimmt
n.w.	nicht nachweisbar

N^2 - <i>t</i> -Boc- N^6 -Cbz-Lysin	N^2 - <i>tert</i> -Butoxycarbonyl- N^6 -Benzyloxy-Lysin
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NPO	N^5 -2-Pyrimidylornithin
OP-Lysin	<i>2-Ammonio-6-(3-oxidopyridinium-1-yl)hexanoat</i>
PDHDC	<i>4-Pyrimidyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehyde</i>
PH	Phenylhydrazin
ppm	<i>parts per million</i>
RP	<i>reversed phase</i>
SB	Sonnenblumenöl
SIRT	Sirtuin
TBARS	<i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
UHPLC-HRMS	Ultra-Hochleistungs-Flüssigchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie
UHT	Ultrahocherhitzt
UV	Ultravioletter spektraler Bereich (<400 nm)
VIS	Visueller spektraler Bereich (400-800 nm)

In den Abbildungen werden zur Übersichtlichkeit die Kurzbezeichnung Lys für den entsprechenden Rest des Lysin Moleküls bzw. Arg für Arginin verwendet. Wichtige englischsprachige Begriffe werden kursiv dargestellt.

1 Einleitung

Kohlenhydrate, Proteine und Lipide stellen die drei Makronährstoffe dar und sind für die menschliche Ernährung essentiell. Während der Zubereitung und der Lagerung von Lebensmitteln kommt es zu umfangreichen Interaktionen verschiedener Inhaltsstoffe, die schließlich zu Fragmentierungsreaktionen von Kohlenhydraten als auch Lipiden führen. Hierbei werden Kohlenhydrate überwiegend aminkatalysiert durch die Maillard-Reaktion abgebaut, während ungesättigte Lipide gemäß radikalischen oder photochemischen Oxidationsmechanismen fragmentieren können.¹⁻³ Trotz der grundsätzlich unterschiedlichen Mechanismen führen beide Reaktionskaskaden gleichermaßen zu aromapotenten Molekülen, die z.B. zu den produkttypischen und erwünschten sensorischen Eindrücken wie Farbe, Geruch und Geschmack von Lebensmitteln führen. Auf der anderen Seite werden durch diese Fragmentierungsreaktionen jedoch zeitgleich Moleküle gebildet, welche für Fehlgerüche verantwortlich sind oder toxische Eigenschaften aufweisen.^{4,5}

Sowohl die Abbaureaktionen der Lipide, als auch der Kohlenhydrate führen zu einer Vielzahl von Carbonyl-Strukturen mit unterschiedlicher Kettenlänge. Innerhalb der Maillard-Reaktionskaskade stellen 1,2-Dicarbonylverbindungen die zentralen Intermediate dar, welche auch direkt mit den nucleophilen Seitenketten von Proteinen irreversible Kondensations- und Cyclisierungsreaktionen eingehen.^{6,7} Dies führt zu der Ausbildung einer heterogenen Gruppe an stabilen Proteinmodifikationen, welche als *Advanced Glycation End Products* (AGEs) bezeichnet werden. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist die Identifikation und strukturelle Charakterisierung von neuartigen AGEs nach wie vor ein aktuelles Themengebiet. Ausgehend von umfangreichen Modelluntersuchungen wurden zahlreiche dieser stabilen AGEs an den Protein-Seitenketten von Lysin- und Arginin identifiziert.⁸⁻¹⁴ Trotzdem wurden in Lebensmitteln die Proteinmodifikationen durch die Maillard-Reaktion lediglich auf Grundlage von nur wenigen ausgewählten AGE-Markerstrukturen beschrieben.^{15,16} In Analogie hierzu tragen die aus der Lipidperoxidation gebildeten Carbonyl-Strukturen parallel zu Proteinmodifikationen bei, welche in Analogie oftmals als *Advanced Lipoxidation End Products* (ALEs) bezeichnet werden.⁷ Jedoch war auch die Identifikation einzelner ALEs im Wesentlichen auf Modellinkubationen beschränkt und über die Bedeutung dieser Reaktionswege in fettreichen Lebensmitteln ist wenig bekannt. Im Zuge der Lebensmittel-Prozessierung werden durch hohe Temperaturen, drastische pH-Werte, Eintrag von Sauerstoff sowie durch unkontrollierte enzymatische Aktivitäten die Bildungen von reaktiven Intermediaten der Maillard-Reaktion als auch Lipidperoxidation forciert, welche durch weitere nicht-enzymatische Folgereaktionen direkt zu AGEs bzw. ALEs führen. Die Auswirkungen der gebildeten Proteinmodifikationen sind vielfältig. So können AGEs die Konformation von Proteinen durch intramolekulare Quervernetzung beeinflussen oder

Proteine intermolekular vernetzen.¹⁷ Daneben werden Ladung und Hydrophobizität verändert, welche zu veränderten technofunktionalen Eigenschaften von Proteinen in Lebensmitteln führen können. Darüber hinaus wird eine ernährungsphysiologische Bewertung der so gebildeten unnatürlichen Aminosäuren in der Literatur diskutiert.¹⁸ Prinzipiell ging ein steigender Modifikationsgrad der Proteine durch AGEs mit einer verminderten endogenen Proteolyse sowie dem Verlust der Bioverfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren wie Lysin einher.¹⁸⁻²⁰ Aufgrund der heterogenen Strukturelemente resultieren jedoch unterschiedliche biochemische oder physiologische Eigenschaften einzelner AGEs. Auf der einen Seite konnte gezeigt werden, dass einige Strukturen aus der Nahrung resorbiert werden und in den Kreislauf übergehen.^{21,22} Auf der anderen Seite konnte die Metabolisierung ausgewählter AGEs durch verschiedene Darmbakterien nachgewiesen werden.^{23,24} Daneben wird der Einfluss von AGEs auf die Allergenität von verschiedenen Proteinen diskutiert.^{25,26} Der steigende Konsum von prozessierten Lebensmitteln geht auch mit einem zunehmenden Anteil an zugeführten AGEs in der täglichen Diät einher. Die ernährungsphysiologische Bewertung der exogenen Zufuhr von AGEs erfordert die Kenntnis des Modifikationsgrades der entsprechenden Proteine. Hierfür wurden beispielsweise immunochemische Hochdurchsatz-Methoden entwickelt, um mit diesen AGEs in zahlreichen Lebensmittelgruppen zu quantifizieren, jedoch wurden die so erhaltenen Ergebnisse sowohl von einer mechanistischen als auch methodischen Sichtweise aus vielfach kritisiert.²⁷⁻²⁹ Von einem modernen analytischen Verständnis aus sollte die Bestimmung von AGEs in komplexen Matrices durch chromatographische Analysemethoden in Verbindung mit massenspektrometrischer Detektion erfolgen, welche letztlich immer auf der arbeitsintensiven Quantifizierung einzelner Strukturelemente basiert.

Die grundsätzlichen Reaktionen der Maillard-Reaktion sowie Lipidperoxidation laufen auch *in vivo* ab und führen zu einer stetigen Modifikation endogener Proteine, auch wenn diese Modifikationen in physiologischen Systemen im Vergleich zu den drastischen Bedingungen der Lebensmittel-Prozessierung deutlich langsamer verlaufen. Hierbei kommt der Modulation der funktionellen Integrität von Proteinen eine besondere Bedeutung zu, welche durch eine Proteinmodifikation negativ beeinflusst werden kann. Besonders Proteine mit einer langen Halbwertszeit werden kumulativ modifiziert. In zahlreichen Studien konnte anhand von verschiedenen AGEs eine Korrelation des Modifikationsgrads von endogenen Proteinen mit der Alterung sowie den pathophysiologischen Krankheitsbildern wie Katarakt, Diabetes oder Urämie gezeigt werden.^{6,30-32} Die strukturellen Charakterisierungen und Identifizierungen neuartiger Proteinmodifikationen in prozessierten Lebensmitteln sowie die Aufklärung der Bildungsmechanismen können auch wichtige Impulse für die Ausrichtung des Forschungsschwerpunkts zum Verständnis der nicht-enzymatischen Proteinmodifikationen *in vivo* geben.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Bildung von Carbonyl-Strukturen innerhalb der Maillard-Reaktion und Lipidperoxidation

2.1.1 Maillard-Reaktion und die Bildung von 1,2-Dicarbonylen

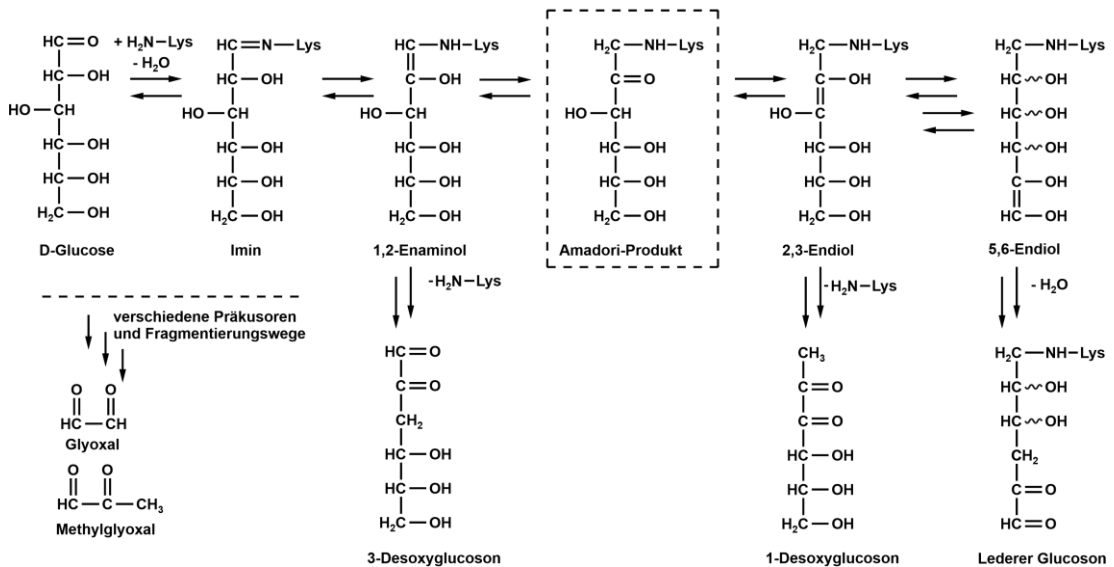


Abbildung 1: Bildung des Amadori-Produkts sowie ausgewählter 1,2-Dicarbonyle im Zuge der Maillard-Reaktion am Beispiel der Reaktionen von Glucose und Lysin.

Der Name Maillard-Reaktion geht auf den Franzosen Louise Camille Maillard zurück, welcher bereits 1912 eine Bräunung während des Erhitzens von Aminosäuren in Gegenwart von reduzierenden Zuckern beobachtete. Diese von ihm namentlich geprägte nicht-enzymatische Bräunung kann von einer heutigen Sichtweise aus durch die Ausbildung von stabilen und hochpolymeren Endprodukten (Melanoidine) erklärt werden, welche am Ende der komplexen Maillard-Reaktionskaskade stehen.² Diese kann von einer historisch-mechanistischen Sichtweise aus in drei Teile unterteilt werden. In der Initialphase reagieren Amin-Verbindungen mit reduzierenden Zuckern unter Ausbildung von Schiffsbasen, welche sich dann zu etwas stabileren Amadori-Produkten umlagern (Abbildung 1). Die fortgeschrittene Phase ist durch zahlreiche Isomerisierungs-, Dehydratisierungs-, und Fragmentierungsreaktionen gekennzeichnet und führt zu einem breiten Portfolio an reaktiven 1,2-Dicarbonylverbindungen, welche als die zentralen Intermediate der Maillard-Reaktion angesehen werden können.¹⁸ Wichtige Vertreter sind hierbei die C6-Körper 1-Desoxyglucoson (1-DG) und 3-Desoxyglucoson (3-DG) sowie die kurzketigen C2- bzw. C3-Körper Glyoxal (GO) und Methylglyoxal (MGO). Die weiteren Reaktionen mit Aminosäuren und Proteinen führen dann in der Endphase zu einem komplexen Produktgemisch, welches durch die Ausbildung der bereits beschriebenen Melanoidine, als auch von aromapotenten und flüchtigen Strukturen charakterisiert ist.³³ Daneben werden nucleophile Aminosäuren wie Lysin und Arginin kovalent und irreversibel unter Ausbildung

von AGEs modifiziert.^{2,3} Von einer modernen Sichtweise aus umfasst die Maillard-Reaktion hingegen grundsätzlich alle Folgereaktionen der 1,2-Dicarbonylverbindungen, unabhängig von deren mechanistischen Herkunft.⁶

Die zentrale Schlüsselstellung von GO und MGO hinsichtlich der Ausbildung von AGEs brachte Sie in den Fokus von umfangreichen mechanistischen Untersuchungen. Auf Grundlage des heutigen Kenntnisstandes verläuft die Bildung von GO und MGO durch parallele enzymatische und nicht-enzymatische Fragmentierungswege von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lipiden. So sind GO und MGO seit langer Zeit bekannte Abbauprodukte von Mono- und Disacchariden sowie der Ascorbinsäure und werden thermisch unter sogenannter Karamellisierung, als auch unter weitaus milderer Bedingungen aminkatalysiert im Zuge der Maillard-Reaktion gebildet.³⁴ Unter Maillard-Bedingungen wird GO aus der Schiffschen Base, dem Glucoson und der Glucose gebildet.³⁵⁻³⁸ Allgemein kommt hierbei Glykolaldehyd (GA) eine besondere Bedeutung zu, welches leicht zu GO oxidiert werden kann. Dies kann auch die Bildung von GO aus Threoson erklären, welches durch eine hydrolytische β -Fragmentierung zu GA fragmentieren kann.³⁹ Trotz zahlreicher Modellversuche und Verwendung von isotoopenmarkierten Kohlenhydraten, sind die mechanistischen Bildungswege von MGO im Zuge der Zuckerfragmentierung bis zum heutigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt. So konnte in einem Maillard-Inkubations-Modell aus Alanin und ¹³C-markierter Glucose die Bildung von GO und MGO entlang des gesamten Kohlenstoffskeletts nachgewiesen werden.³⁶ Ein weit verbreiteter postulierter Bildungsmechanismus von MGO erfolgt über eine Retro-Aldol-Fragmentierung der zunächst gebildeten Desoxyglucosone 1-DG sowie 3-DG.^{37,40} Jedoch wird dieser Mechanismus aufgrund der unvollständigen Bilanzierung der resultierenden Fragmente, welche bei der Spaltung des Grundkörpers unter Freisetzung von MGO entstehen, kontrovers diskutiert.⁴¹ Daneben sind eine Reihe von enzymatischen Bildungswegen *in vivo* bekannt. So wird MGO beispielsweise im Zuge des Aminosäure- sowie Fettstoffwechsels gebildet. Der Katabolismus von Threonin und Glycin führt zu Aminoaceton, welches durch eine semicarbazid sensitive Aminooxidase zu MGO deaminiert wird.⁴²⁻⁴⁶ Daneben kann Aceton über Acetol enzymatisch durch p450 zu MGO oxidiert werden.⁴⁵ Weiterhin stellen die glykolytischen Intermediate Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) wichtige Präkursoren von MGO dar, welches sich nach enzymatischer oder nicht-enzymatischer Phosphat-Eliminierung bildet.^{47,48} Neben einer Vielzahl von Carbonyl-Strukturen werden GO und MGO auch beim oxidativen Abbau von ungesättigten Fettsäuren im Rahmen der Lipidperoxidation gebildet. Dieser Bildungsweg wird speziell in Kapitel 2.1.2.4 behandelt.

2.1.1.2 Quantifizierung von 1,2-Dicarbonylen in Lebensmitteln

Die Analytik der reaktiven 1,2-Dicarbonylverbindungen in komplexen biologischen Proben oder Lebensmitteln erfordert allgemein eine Derivatisierung, um diese in stabile Reaktionsprodukte umzuwandeln. Hierbei sind in der Literatur zahlreiche Derivatisierungsreagenzien beschrieben, welche z.B. Hydrazin-, Hydroxylamin- oder Amin-Derivate darstellen. Die entsprechenden Produkte können dann mit verschiedenen chromatographischen Analysemethoden quantifiziert werden.^{49,50} Eine weit verbreitete Strategie ist die Kondensationsreaktion von 1,2-Dicarbonylen mit *o*-Phenylendiamin unter Ausbildung stabiler Chinoxaline, welche mittels *high performance liquid chromatography* (HPLC) gekoppelt mit UV- (λ_{\max} =312 nm) oder massenspektrometrischer Detektion erfasst werden können.^{49,50} Das Spektrum an bekannten 1,2-Dicarbonylen umfasst heutzutage eine Fülle von Isomerisierungs-, Dehydratisierungs- und Fragmentierungs-Produkten von Mono- und Disacchariden. Die Analytik dieser Strukturen lieferte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von mechanistischen Zusammenhängen innerhalb der Maillard-Reaktion.^{51,52} Trotzdem liegt weiterhin ein Fokus zahlreicher Studien auf der Quantifizierung von 1-DG, 3-DG, GO sowie MGO, wobei letztere aufgrund ihrer Reaktivität entscheidende Intermediate hinsichtlich der Bildung von AGEs darstellen. Unter Verwendung von Hochdurchsatzmethoden ist es gelungen sowohl intrinsische als auch technologische Einflussfaktoren für die Bildung dieser Leitstrukturen in verschiedenen Produktgruppen systematisch zu untersuchen (Tabelle 1).^{53,54}

Tabelle 1: Konzentrationen von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmittel-Matrices.

Lebensmittel	GO	MGO	3-DG	Literatur
Gebrautes Hackfleisch ¹ (Schwein/Rind)	1,0 ± 0,15	2,9 ± 0,62	0,55 ± 0,02	53
Gebraute Hamburger ¹	2,6 ± 0,06	3,9 ± 0,22	0,62 ± 0,19	
Brötchen ¹	2,0 ± 0,3	4,1 ± 0,5	38 ± 3	55
Brot ²	n.b. ⁴	3,0 (n.w. ⁵ -28)	45 (13-619)	54
Kekse ²	n.b.	8,3 (1,8-68)	129 (8,5-385)	
Bier ²	n.b.	0,5 (n.w.-1,0)	34 (18-54)	
Kekse ²	16,4 (4,8-20,5)	16,6 (3,7-78)	n.b.	56
Bier ³	0,29-0,42	0,12-0,25	8,6-17,2	57
Honig ²	1,7 (n.w.-4,6)	3,1 (n.w.-5,7)	342 (119-1451)	58
Manuka Honig ³	0,7-7,0	38-761	563-1060	59
Manuka Honig ²	n.b.	356 (66-684)	n.b.	

¹Mittelwert ± Standardabweichung, ²Median (Konzentrationsspanne), ³Konzentrationsspanne, ⁴nicht bestimmt, ⁵nicht nachweisbar

Aus quantitativer Sicht stellte 3-DG in kohlenhydratreichen Lebensmitteln hierbei in der Regel die bedeutendste 1,2-Dicarbonylverbindung dar. Die *steady-state* Konzentrationen von 1,2-Dicarbonylen sind jedoch von dem Verhältnis der Neubildungen sowie der Folgereaktionen abhängig, welche durch individuelle Reaktivitätsunterschiede maßgeblich beeinflusst werden. Dies wird allgemein durch die parallele Analyse von Markersubstanzen

für proteingebundene 1,2-Dicarbonylverbindungen berücksichtigt. Zusammengefasst können 1,2-Dicarbonyle somit gleichermaßen während der Fermentation, Lagerung oder unter harschen Prozessierungs-Bedingungen wie Braten, Frittieren und Backen von Lebensmitteln gebildet, als auch durch weitere Folgereaktionen abgebaut werden.^{55,60} Der Nachweis von MGO in Lebensmitteln erlangte durch den neuseeländischen Manuka Honig eine höhere Aufmerksamkeit. Dieser zeichnet sich durch eine antibakterielle Wirkung aus, welche auf die hohen Konzentrationen von MGO (38,4-761 mg/kg) zurückgeführt wurde und damit quantitativ die Schwankungsbreiten der verschiedenen Lebensmittelgruppen zum Teil um Zehnerpotenzen übersteigen.^{58,59} Von einer mechanistischen Sichtweise aus wurden diese hohen Gehalte an MGO durch die Bildung aus Dihydroxyaceton erklärt, welches im Nektar der Blüten des Manuka Baums (*Leptospermum scoparium*) enthalten ist und während der Lagerung nicht-enzymatisch zu MGO umgewandelt wird.^{61,62}

2.1.2 Lipidperoxidation und die Bildung von Sekundärprodukten

2.1.2.1 Grundlegende Reaktionsmechanismen der Lipidperoxidation

Neben dem Kohlenhydratabbau stellt die Lipidperoxidation einen weiteren wichtigen Bildungsweg für Carbonyl-Strukturen sowohl in Lebensmitteln als auch *in vivo* dar.⁶³ Hierbei stehen ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure, Linolensäure oder Arachidonsäure im Fokus, welche radikalisch oder photochemisch zu Hydroperoxiden oxidiert werden können. Wie in Abbildung 2 beispielhaft anhand der radikalischen Autoxidation von Linolsäure dargestellt wird, erfolgt zunächst die bevorzugte Abspaltung eines Wasserstoffatoms an Position 11.⁶⁴ Diese Abstraktion ist energetisch bevorzugt, da das entsprechende Radikal innerhalb eines 1,4-Pentadien-Systems durch Resonanz stabilisiert wird. Die nachfolgende Anlagerung von Sauerstoff erfolgt gleichermaßen an Position 9 und 13.⁶⁴ Die so gebildeten Peroxyradikale der Linolsäure führen den radikalischen Kettenmechanismus durch die Abstraktion von weiteren Wasserstoffatomen fort und werden dadurch in die entsprechenden Hydroperoxide überführt (Abbildung 3). Prinzipiell sind auch die initialen Abspaltungen der α -ständigen Wasserstoffatome an Position 14 und 8 möglich, jedoch sind diese aus energetischen Gesichtspunkten ungünstiger und treten mengenmäßig deutlich zurück. Die folgend gebildeten 8-, 10-, 12- bzw. 14-Hydroperoxide beschreiben aus quantitativer Sicht nur etwa 4% der gebildeten Hydroperoxide, während der größte Teil gleichermaßen auf die entsprechenden 9- und 13-Hydroperoxide zurückgeführt werden kann.^{64,65}

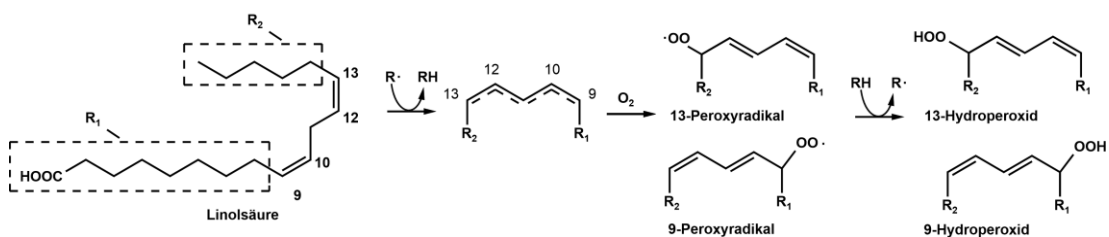


Abbildung 2: Radikalische Oxidation von Linolsäure und Ausbildung von Hydroperoxiden.

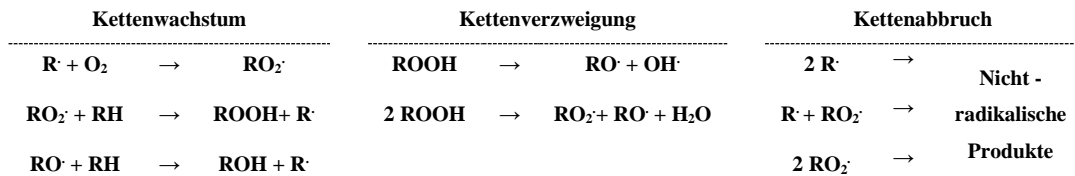


Abbildung 3: Schematische Darstellung des radikalischen Kettenmechanismus der Autoxidation von Lipiden.

Die Hydroperoxide stellen die zentralen Intermediate der Lipidperoxidation dar und neigen zu weiteren Fragmentierungen. Das gebildete Produktspektrum ist maßgeblich von der entsprechenden Position der initial gebildeten Hydroperoxide und damit direkt von der eingesetzten Fettsäure abhängig. Die Vielschichtigkeit der möglichen Hydroperoxide geht mit einem facettenreichen Produktspektrum an sekundären Carbonylverbindungen unterschiedlicher Kettenlänge einher, die in die Strukturklassen der Kohlenwasserstoffe, Carbonsäuren, Alkanale, α -substituierte Alkanale, Alkenale, Alkadienale, 4-Hydroxy-2-alkenale sowie Dicarbonylen weiter unterteilt werden können (Abbildung 4).^{66,67} Besonders die kurzkettigen, flüchtigen Carbonyl-Strukturen beeinflussen entscheidend die sensorischen Eigenschaften und die damit verbundene Qualität von Lebensmitteln.⁶⁸ Auf der anderen Seite sind Reaktionen dieser Carbonylverbindungen mit Bestandteilen von Makromolekülen wie z.B. den nucleophilen Seitenketten von Proteinen (Kapitel 2.4) oder den Basen der DNA bekannt. Dies brachte Sie auch in den Fokus von toxikologischen Untersuchungen sowie in Diskussion über deren kanzerogene oder mutagene Eigenschaften.⁶⁹⁻⁷³

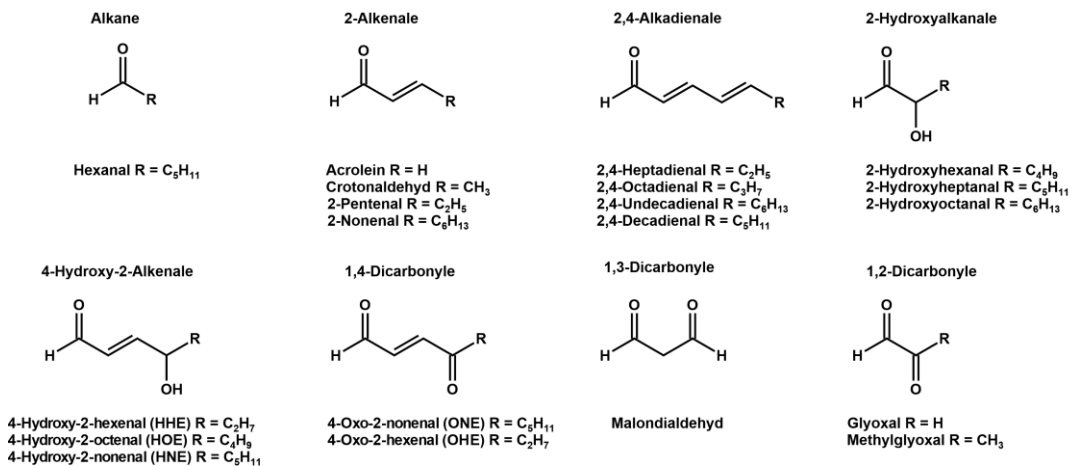


Abbildung 4: Darstellung einer Auswahl an Carbonyl-Strukturen, welche im Zuge der Lipidperoxidation gebildet werden.

Eine in der Literatur oftmals vorgeschlagene mechanistische Erklärung für die Fragmentierungsreaktionen von Hydroperoxiden stellt die α -Fragmentierung dar.¹ Hierbei erfolgt zunächst die Bildung eines intermediären Alkoxy-Radikals, welche durch Metallionen katalysiert werden kann. Anschließend kommt es zur Spaltung der α -ständigen Kohlenstoffatome unter Ausbildung eines Aldehyds, sowie eines reaktiven Alkylradikals. Prinzipiell kann die Carbonylgruppe sowohl auf Seite des carboxyterminalen als auch des endständigen Teils durch die Fragmentierung hervorgehen (Abbildung 5).^{63,65} Die energetisch

bevorzugte Ausbildung von konjugierten Carbonylverbindungen gibt jedoch den jeweiligen dominierenden Fragmentierungsweg vor. Beispielhaft wird die α -Fragmentierung des 9-Hydroperoxids der Linolsäure in Abbildung 5 dargestellt, wobei der bevorzugte Fragmentierungsweg (B) 2,4-Decadienal ergibt.^{1,65}

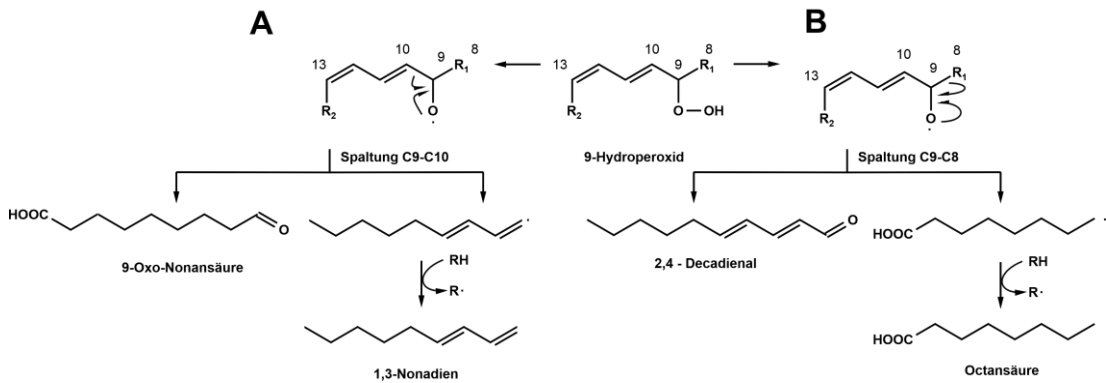


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mechanismus der α -Fragmentierung am Beispiel des 9-Hydroperoxids der Linolsäure.

Die so gebildeten ungesättigten Carbonyl-Strukturen wie z.B. 2,4-Decadienal stellen oftmals keine stabilen Produkte dar und neigen zu weiteren oxidativen Fragmentierungsreaktionen unter Ausbildung von Tertiärprodukten, welche das Produktspektrum nochmals deutlich auffächern. Beispielsweise führte die Fragmentierung von 2,4-Decadienal zur Bildung von Hexanal oder GO.⁷⁴ Die diskutierte radikalische Reaktionsfolge kann gleichermaßen auf alle ungesättigten Fettsäuren unter Ausbildung von entsprechenden Hydroperoxiden übertragen werden. Die Position der gebildeten Hydroperoxide folgt der jeweils energetisch bevorzugten initialen Abspaltung der Wasserstoffatome.¹ So gehen aus Ölsäure zu nahezu gleichen Teilen die entsprechenden 8-, 9-, 10- und 11-Hydroperoxide hervor, während aus Linolensäure 9-, 12-, 13-, und 16-Hydroperoxide gebildet werden.^{1,75} Daneben gehen Hydroperoxide auch durch einen zweiten photochemischen Bildungsweg hervor. Aufgrund des unterschiedlichen Bildungsmechanismus führt die Fotooxidation von ungesättigten Fettsäuren jedoch zu einem anderen Produktspektrum an Hydroperoxiden.¹ Beispielsweise stellen die 9- und 10-Hydroperoxide die einzigen Produkte der Fotooxidation der Ölsäure dar, während die Bildungen der 9-, 10-, 12- und 13-Hydroperoxide durch die Linolsäure sowie 9-, 10-, 12-, 13-, 15-, 16-Hydroperoxide aus Linolensäure verstanden sind.¹ Die entsprechenden Fragmentierungsmöglichkeiten der gebildeten Hydroperoxide, als auch der daraus folgenden Sekundärprodukte erklären das komplexe Produktspektrum der Lipidperoxidation. Zusätzliche Reaktionswege der Hydroperoxide wie beispielsweise Cyclisierungen oder alternative Fragmentierungsmechanismen bieten weitere mechanistische Erklärungen für die Ausbildung einzelner Fragmentierungs-Produkte.⁶³ Die in Abbildung 5 dargestellte 9-Oxo-nonansäure stellt die Grundstruktur eines Vertreters der *glycerol-bound oxidized fatty acids* (GOFAs) dar, bei denen die ausgebildeten Funktionalitäten innerhalb der Seitenkette des

Triglycerids Angriffspunkte für entsprechende Modifikationsmöglichkeiten mit z.B. Proteinen darstellen.⁷⁶ Die vorliegende Arbeit setzt ihren Fokus hingegen auf die Darstellung der freien Sekundärprodukte der Lipidperoxidation.

2.1.2.2 Bildung von Alkanalen und Alkenalen

Das umfangreiche Produktspektrum an Alkanalen und Alkenalen kann über den Mechanismus der β -Fragmentierung der initial gebildeten Hydroperoxide gebildet werden. Dies erklärt auch das unterschiedliche Produktportfolio ausgehend von Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren. Beispielsweise wird Hexanal direkt aus dem 13-Hydroperoxid der Linolsäure sowie dem 15-Hydroperoxid der Arachidonsäure gebildet und stellt eine wichtige oxidative Markersubstanz für den Fortschritt der Lipidperoxidation von Omega-6-Fettsäuren dar.⁷⁷ Propanal entspricht dem mechanistischen Pendant aus Omega-3-Fettsäuren wie Linolensäure.⁶³ Wie bereits beschrieben, stellen die Folgereaktionen von ungesättigten Alkenalen unter weiterer Fragmentierung einen zweiten wichtigen Bildungsweg von Alkanalen dar.⁶³ Das Spektrum von Alkanalen und Alkenalen wird überwiegend durch Grundkörper mit drei bis zehn Kohlenstoffatomen beschrieben, die in zahlreichen Modellinkubationen unter Beteiligung von einzelnen Fettsäuren als auch Speiseölen quantifiziert wurden. Hierbei stellen einzelne Carbonylverbindungen auch spezifische Marker für die Lipidperoxidation von Omega-3- bzw. Omega-6-Fettsäuren dar.⁷⁸⁻⁸⁰ Letztlich wird das Analyt-Spektrum auch durch unterschiedliche Flüchtigkeiten sowie Folgereaktionen von Alkanalen und Alkenalen beeinflusst, wobei einzelne Strukturen akkumulieren können. Beispielsweise können Alkanale wiederum zur entsprechenden Säure oxidiert werden, die zusammen mit den Präkursoren auftreten.^{81,82} Den flüchtigen Säuren kommt auch eine wichtige analytische Bedeutung im Zuge der Racimat-Methode zu Teil, bei welcher die Oxidationsstabilität von Ölen über die Freisetzung von flüchtigen Komponenten konduktometrisch bestimmt wird.⁸³ Allgemein sind Alkanale als aromapotent Moleküle verstanden. Beispielsweise stellt 2,4-Decadienal eine erwünschte Aromakomponente in einigen frittierten Produkten wie Kartoffelchips oder Pommes frites dar (Tabelle 2). Die Bildung von 2,4-Decadienal ist stark von der Fettsäurezusammensetzung des verwendeten Öls abhängig, sodass Linolsäure-reiche Öle wie Sonnenblumenöl zu höheren Gehalten an 2,4-Decadienal in Kartoffelchips führten.⁸⁴ Die Oxidation von Omega-3-Fettsäuren führte hingegen zu 2,4-Heptadienal.⁸⁰

Tabelle 2: Konzentrationen von Hexanal, 2,4-Decadienal, Propanal und 2,4-Heptadienal in Modellsystemen der Lipidperoxidation sowie in Lebensmitteln.

Matrix	Bedingungen	Hexanal	2,4-Deca- dial ¹	Propanal	2,4-Hepta- dial	Literatur
		[mg/kg]				
Zubereitetes Fleisch (Schwein, Hühnchen, Rind)	verschiedene Kochbedingungen	0,13-0,50	n.w.-0,22	n.b.	n.b.	85
	gelagert (4°C) und zubereitet	0,23-5,87	0,01-0,29	n.b.	n.b.	
Hühnchen	116°C, 30 min	1,59	0,33	n.b.	n.b.	86
Hühnchen	70°C, 30 min nach Lagerung (4°C)	11,33	0,07	n.b.	n.b.	
Sonnenblumenöl	180°C, 12 h	2,41	57,9	n.b.	n.b.	87
Sonnenblumenöl		966,8	210,7	n.w.	n.w.	88
Rapsöl	62°C, 15 Tage	46,7	n.w.	22,1	25,8	
Sojaöl		530,0	158,8	78,8	49,3	
Kartoffelchips, frittiert	180°C, 2,5 min	n.b.	4,7	n.b.	n.b.	84
	Sonnenblumenöl Kokosfett	n.b.	0,40	n.b.	n.b.	
Margarine	150°C, 7 min	n.b.	21,3	n.b.	n.b.	89
Arachidonsäure		1408,5	24,0	n.w.	n.w.	80
Docosapentaensäure (n-6)	10 mM	1327,7	26,3	n.w.	n.w.	
Eicosapentaensäure	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	1,1	n.w.	626,2	130,6	
Docosapentaensäure (n-3)	37°C, 1 h	n.w.	n.w.	492,5	65,6	
Docosahexaensäure		n.w.	n.w.	681,4	90,2	

¹Summe der (E/E)- und (E/Z)-Isomere.

Acrolein und Crotonaldehyd stellen die kürzesten 2-Alkenal-Strukturen dar, welche im Zuge der Lipidperoxidation gebildet werden. Großtechnisch dient Acrolein als Ausgangsstoff für die Produktion von Acrylsäure, die für die weitere Polymersynthese von Acrylaten genutzt wird.⁹⁰ Daneben wird Acrolein allgemein bei Verbrennungsvorgängen, als auch bei der Erhitzung von Ölen gebildet.⁹⁰ Acrolein ist aufgrund des starken elektrophilen Charakters im Fokus von Forschungsarbeiten. Beispielsweise reagierte Glutathion (GSH) mit Acrolein etwa hundertmal schneller als mit Crotonaldehyd oder 4-Hydroxynonenal (4-HNE).⁹¹ Acrolein konnte in thermischen Inkubationen von Trioleat, Trilinoleat und Trilinolenat nachgewiesen werden und die Ausbeuten korrelierten hierbei mit dem Grad der Unsatigung der eingesetzten Fettsäuren.^{92,93} Diese Ergebnisse wurden auch in eiseninduzierten Modellinkubationen bestätigt, bei denen oxidierte Linolensäure höhere Mengen an Acrolein und Crotonaldehyd bildete als Linolsäure.⁹⁴ Auch in thermischen Oxidationsexperimenten von verschiedenen Pflanzenölen korrelierte der Gehalt an Acrolein mit der Unsatigung sowie der Temperatur (Tabelle 3).⁹³ Ein möglicher Bildungsmechanismus von Acrolein wurde ausgehend von einer weiteren Oxidation von 2,4-Decadienal sowie nachfolgender α -Fragmentierung postuliert.⁹² Daneben wurde die Bildung direkt aus dem intakten Gerüst des oxidierten

Linolsäuremethylesters durch die Fragmentierung von Dihydroperoxiden sowie Hydroperoxyepidioxiden vermutet.⁹³ Unabhängig davon ist die Bildung von Acrolein durch die Dehydratisierung von Dihydroxyaceton und Glycerin verstanden und somit auch Teil des Kohlenhydratabbaus.⁹⁵ Die Bildung von Acrolein könnte bei der Triglycerid-Struktur von Lipiden somit sowohl aus dem Grundgerüst von Glycerin als auch aus den (mehrfach) ungesättigten Fettsäureresten erfolgen. Der direkte Vergleich unter Verwendung von isotope markierten Triglyceriden zeigte jedoch, dass beim Erhitzen (4 h, 140°C) der Beitrag von Glycerin vernachlässigbar ist und Acrolein nahezu vollständig aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren stammte.⁹²

Tabelle 3: Konzentrationen von Acrolein und Crotonaldehyd in Modellsystemen sowie in Lebensmitteln.

Matrix	Bedingungen	Acrolein	Crotonaldehyd	Literatur
		[mg/kg]		
Leinöl	180°C, 2-24 h	94,1-207,8	n.b.	96
Kokosfett	180°C, 2-24 h	1,3-8,1	n.b.	
Leinöl	180°C, 24 h	51,7	34,2	97
Kokosfett	180°C, 24 h	0,62	0,32	
Maiskeimöl	130°C, 4,6 h	154	n.b.	98
Maiskeimöl	210°C, 1,6 h	648	n.b.	
Donuts, frittiert	180°C, 9 min	0,011-0,016	n.b.	84
Pommes Frites, frittiert	180°C, 4 min	0,012-0,022	n.b.	
Arachidonsäure		803,4	1,2	
Docosapentaensäure n-6	10 mM	1005,4	1,6	
Eicosapentaensäure	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	959,3	29,9	80
Docosapentaensäure n-3	37°C, 1 h	2143,5	47,9	
Docosahexaensäure		1735,5	33,5	

2.1.2.3 Bildung von 4-Hydroxyalkenalen und 2-Hydroxyalkenalen

Innerhalb der Strukturklasse der 4-Hydroxyalkenale stellt 4-HNE die bekannteste Markerstruktur für die Lipidperoxidation dar. Der Bildungsmechanismus beinhaltet die Inkorporation der endständigen Methylgruppe, welche die selektive Bildung von 4-HNE aus Omega-6-Fettsäuren sowie 4-Hydroxyhexenal (4-HHE) aus Omega-3-Fettsäuren erklärt.^{77,99,100} Für 4-HNE wurden gleich mehrere Bildungswege vorgeschlagen.^{73,99,101} Pryor et al. postulierte anhand des 11-Hydroperoxids der Arachidonsäure die Cyclisierung des zunächst gebildeten Alkoxy-Radikals unter Ausbildung eines Sechsrings. Die weitere Oxygenierung und α -Fragmentierung führt dann zu 4-HNE.¹⁰²

Ein weiterer Bildungsweg von 4-HNE verläuft über die Reduktion von 4-Hydroperoxy-2-nonenal (4-HPNE). Die nicht-enzymatische Bildung von 4-HPNE kann ausgehend von Linolsäure sowohl aus der 9-Hydroperoxy-(10E,12Z)-octadecadiensäure (9-HPODE) als auch der 13-Hydroperoxy-(9Z,11E)-octadecadiensäure (13-HPODE) über unterschiedliche Mechanismen erfolgen. 9-HPODE wird zunächst durch eine Hock-Spaltung

zu Nonenal abgebaut, welches folgend zu 4-HPNE oxidiert wird.¹⁰³ Der Reaktionsweg über 13-HPODE erfolgt zunächst durch eine weitere Oxygenierung an Position 10, welche zu einem instabilen doppelten Hydroperoxid führt. Anschließend ergibt die säurekatalysierte Hock-Umlagerung sowie Spaltung direkt 4-HPNE.¹⁰³

2-Hydroxyheptanal wird aus Omega-6-Fettsäuren wie Arachidonsäure und Linolsäure gebildet.^{104,105} In einer durch Eisen-Ascorbat getriggerten Oxidation von Linolsäure wurde 2-Hydroxyheptanal als eines der Hauptprodukte mit einer Ausbeute von 0,8 mol-% quantifiziert, während auch kleine Mengen an 2-Hydroxyhexanal nachgewiesen wurden.¹⁰⁴ Allgemein lagen die Konzentrationen von 2-Hydroxyheptanal in den Inkubationen von Arachidonsäure und Linolsäure in einem Größenordnungsbereich mit 4-HNE.^{104,105} 2-Hydroxybutanal geht hingegen aus der Lipidperoxidation von Omega-3-Fettsäuren wie Docosahexaensäure oder Linolensäure hervor.^{67,106} In Rinderleber konnten 2-Hydroxybutanal (0,16 mg/kg Fett), 2-Hydroxyhexanal (0,66 mg/kg Fett) und 2-Hydroxyheptanal (2,39 mg/kg Fett) als auch geringe Mengen von 2-Hydroxyoctanal und 2-Hydroxynonanal nachgewiesen werden.¹⁰⁷ Letztere Strukturen stellten Oxidationsprodukte der Ölsäure dar.¹⁰⁷ 2-Hydroxyheptanal wurde auch in oxidierten *low density lipoprotein* (LDL) sowie *high density lipoprotein* (HDL) nachgewiesen.¹⁰⁸ Es sind auch kurzkettige (n-1)-Hydroxy-n-oxo-Fettsäuren bekannt, welche als Fragmentierungs-Produkte unter Erhalt des C-Terminus GOFAs darstellen und in geringen Mengen auch in Rinderleber nachgewiesen werden konnten.^{105,107,109}

2.1.2.4 Bildung von 4,5-Epoxy-2-alkenale

Ein postulierter Bildungsweg von 4,5-(E)-Epoxy-2-(E)-decenal (EP-decenal) verläuft durch die Fragmentierung der C8-C9 Bindung von 12,13-(E)-Epoxy-9-hydroperoxy-10-octadecensäure, welche direkt aus der initialen 13-HPODE gebildet wird.¹¹⁰ Ein zweiter Bildungsmechanismus geht von 9-HPODE aus, welche in Modellsystemen einen noch effizienteren Präkursor für EP-decenal darstellte.⁸⁹ Dieser alternative Bildungsweg verläuft zunächst über 2,4-Decadienal, welches aus 9-HPODE hervorgeht (Abbildung 5) und unter weiterer Oxidation zu EP-decenal führt.⁸⁹ In Untersuchungen von aufgereinigten Hydroperoxiden des Linolensäuremethylesters konnte hingegen die Bildung von 4,5-(E)-Epoxy-2-(E)-heptenal (EP-heptenal) als eine Minorkomponente mittels Pyrolyse-Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS) nachgewiesen werden.¹¹¹ Im Kontext der Aromaextrakt-Verdünnungsanalyse wurde EP-decenal als eine Aromakomponente in Brot, Fleisch und Butter nachgewiesen, die zum Teil auch zu unerwünschten sensorischen Eindrücken führte.^{112,113} Daneben wurde EP-decenal in erhitzter Margarine (150°C, 7 min) in einem Konzentrationsbereich von 0,1 mg/kg quantifiziert.⁸⁹

2.1.2.5 Bildung von GO und MGO

Die ersten grundlegenden Arbeiten zur Aufklärung der Bildungsmechanismen von GO im Zuge der Lipidperoxidation erfolgten vor mehr als 50 Jahren, wobei der Fokus zunächst auf der Bildung durch die weiteren Fragmentierungen von Alkenalen lag. Lillard et al. identifizierte GO nach Derivatisierung mittels 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) in Inkubationen von 2,4-Heptadienal und 2-Nonenal bei 45°C.¹¹⁴ 2,4-Decadienal führte bei 25°C und unter Einleiten von Sauerstoff zu 0,04 mol-% GO.⁷⁴ Nahezu zeitgleich konnte Michalski et al. in der Inkubation von Sojaöl, welches mit ¹⁴C-markiertem 2,4-Decadienal dotiert wurde, bei 25°C die Bildung von markiertem Malondialdehyd (MDA) und GO nachweisen.⁸¹ Daneben konnte GO auch direkt in unterschiedlichen Inkubationen von Linolsäure bzw. Arachidonsäure in geringen Ausbeuten (0,008-0,06 mol-%) quantifiziert werden.^{104,105,115} Bei der Oxidation von Linolsäuremethylester konnten auch kleine Mengen an MGO (0,0005 mol-%) nachgewiesen werden.¹¹⁵ Die Bildungen von GO und MGO im Zuge der thermisch induzierten Lipidperoxidation konnten durch zahlreiche weitere Beispiele manifestiert werden (Tabelle 4). Jiang et al. berichtete hingegen von der Bildung von GO als auch MGO aus überwiegend gesättigten Fetten wie Butter oder Margarine, deren Gehalte nach 1 h bei 200°C die von Distelöl überstiegen, allgemein aber unterhalb von 2 mg/kg quantifiziert wurden.¹¹⁶ Die genauen mechanistischen Hintergründe für die Bildung der 1,2-Dicarbonyle im Zuge der thermischen Lipidperoxidation sind hingegen nicht abschließend aufgeklärt und für MGO gibt es bisher keine bekannten direkten Vorläuferstrukturen. Aus quantitativer Sicht lagen die Konzentrationen von GO und MGO in den verschiedenen Inkubationen jedoch unterhalb von MDA oder Acrolein.^{80,98,117} Als direktes Reaktionsprodukt von GO mit Lysin konnte *N*⁶-Carboxymethyllysin (CML) in verschiedenen weiteren Oxidationssystemen von ungesättigten Fettsäuren (37-95°C) in Gegenwart von Proteinen bzw. Lysin quantifiziert werden.¹¹⁸⁻¹²² Die Bedeutung der Lipidperoxidation hinsichtlich der Bildung von CML wird im direkten Vergleich zu Maillard-Reaktionswegen kontrovers diskutiert.¹¹⁸⁻¹²²

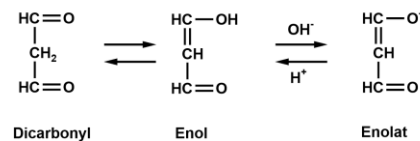
Daneben ist auch die photochemische Bildung von GO und MGO bekannt. Im Kontext der Atmosphärenchemie wurden die ungesättigten 1,4-Dicarbonyle 4-Oxo-2-pental und Butendial als Vorläuferstrukturen für MGO und GO vorgestellt.¹²³ Onyango postulierte Bildungswege von 4-Oxo-2-pental und Butendial innerhalb der Lipidperoxidationskaskade von Omega-3-Fettsäuren, deren weiterer Abbau auch zu GO und MGO führen soll. Die Bedeutung dieser Reaktionswege ist jedoch unklar.¹²⁴ Beim Bestrahlen der Ethylester von Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure bei einer Wellenlänge im UV-Bereich ($\lambda=300$ nm) für 6 h korrelierte die Bildung von Carbonyl-Strukturen direkt mit dem Grad der Unsattheit. So konnten neben GO (0,6-2,9 g/kg), MGO (0,06-0,52 g/kg) auch MDA (0,6-4,3 g/kg) und Acrolein (0,03-0,09 g/kg) quantifiziert werden.¹²⁵

Tabelle 4: Bildung von GO und MGO im Zuge der Lipidperoxidation in verschiedenen Modellsystemen.

Matrix	Bedingungen	GO	MGO	Literatur
		[mg/kg]		
Sardinenöl	37°C, 15 Tage	1,9	n.b.	¹²⁶
Ölsäuremethylester	80°C, 15 h	2,3	4,8	¹²⁷
Linolensäuremethylester	80°C, 20 h	4,7	7,0	
Arachidonsäure		108,4	1,1	
Docosapentaensäure n-6	10 mM	147,4	1,2	
Eicosapentaensäure	(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂	109,8	1,3	⁸⁰
Docosapentaensäure n-3	37°C, 1 h	518,5	1,0	
Docosahexaensäure		207,8	1,6	
Butter	200°C, 1 h	0,17	0,66	¹¹⁶
Distelöl	200°C, 1 h	0,15	0,03	
Maiskeimöl	130°C, 4,6 h	10,9	0,13	⁹⁸
	210°C, 1,6 h	22,0	5,0	
Maiskeimöl	200°C, 1 h	1,6 ¹	0,38 ¹	¹¹⁷
Lebertran	60°C, 7 Tage	5,9 ¹	2,0 ¹	

¹Angabe der Konzentration in parts per million (ppm)

2.1.2.6 Bildung MDA

**Abbildung 6:** Darstellung der Keto-Enol-Tautomerie von MDA.

MDA stellt eine etablierte Markersubstanz für die fortgeschrittene Phase der Lipidperoxidation *in vivo*, als auch in Lebensmitteln dar.¹²⁸ Die freie Dicarbonylform von MDA steht mit der Enolform im Gleichgewicht, welche bei pH-Werten größer des pK_s-Wertes von 4,5 nahezu vollständig in der unreaktiven Form des Enolat-Ions vorliegt (Abbildung 6).⁷⁷ MDA neigt in saurer Lösung zu weiterer Oligomerisierung, welche zu Farbbildung führt und durch Aldolreaktionen erklärt werden kann.^{129,130} Dies begrenzt auch die Lagerfähigkeit von MDA als authentisches Referenzmaterials, welches entweder in Form des Enolat-Anions lagerstabil ist oder durch eine unmittelbare Hydrolyse eines Tetraacetals *in situ* erzeugt wird.⁷⁷ Die Bildung von MDA erfolgt insbesondere durch die Fragmentierung von ungesättigten Fettsäuren mit drei oder mehr Doppelbindungen. Dies lässt sich mit einem von Pryor und Stanley postulierten Bildungsweg über ein bicyclisches Endoperoxid erklären, welches aus ungesättigten Fettsäuren mit drei oder mehr Doppelbindungen nicht-enzymatisch gebildet werden kann und thermisch bzw. säurekatalytisch zu MDA fragmentiert (Abbildung 7).¹³¹ Um diesen Reaktionsweg mechanistisch zu verifizieren, war zunächst die Isolation des bicyclischen Endoperoxids nötig. Erste indirekte spektroskopische Hinweise für die Bildung entsprechender Endoperoxide ergaben sich in einer aufgereinigten Fraktion von oxidiertem Linolensäure, welche zuvor mittels Zinn(II)-chlorid reduziert wurde um die potentiell

gebildeten Endoperoxide in entsprechend stabile Triolsysteme zu überführen. Eine abschließende Strukturaufklärung war zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht möglich.¹³² In nachfolgenden Arbeiten gelang dann die Isolierung von zwei Bicycloendoperoxid-Isomeren aus einer Inkubation von Linolensäuremethylester, welcher mittels Lipoxygenase oxidiert wurde.¹³³ Frankel et al. inkubierte ein isoliertes Hydroperoxy-Bicycloendoperoxid bei Raumtemperatur in wasserfreiem und salzsaurem Methanol in Gegenwart von Trimethylorthoformat. Unter diesen Bedingungen wurden 0,8% (w/w) in MDA umgewandelt, welches als Tetramethylacetal gaschromatographisch analysiert wurde.¹³⁴ Ähnliche Ausbeuten ergaben Reaktionen mit 1,08% (w/w) Hydroperoxy-bis-epidioxid während die entsprechenden Monohydroperoxide von Linolsäure und Linolensäuren hingegen nur 0,04-0,10% (w/w) zeigten.¹³⁴

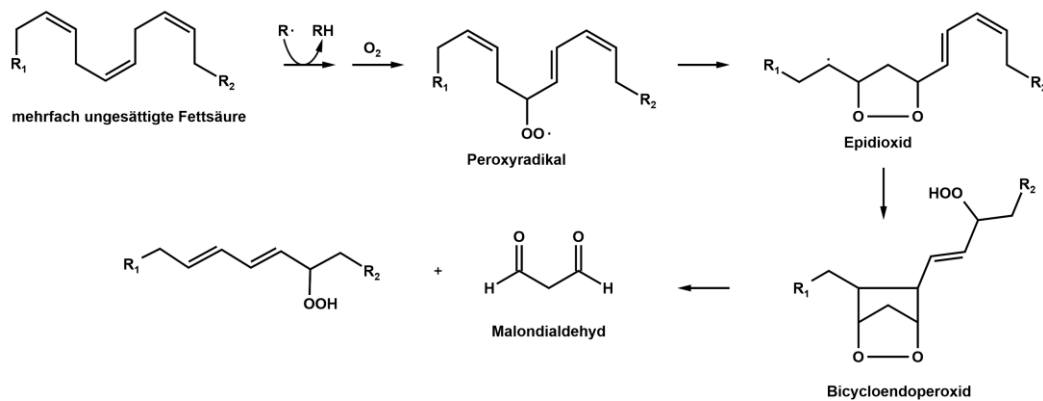


Abbildung 7: Postulierter Bildungsmechanismus von MDA durch Fragmentierung eines bicyclischen Endoperoxids.

Esterbauer et al. postulierte zwei weitere Reaktionsmechanismen, welche durch die doppelten α -Fragmentierungen von Arachidonsäure zu MDA führen sollen und grundsätzlich auf alle Fettsäuren mit mehr als zwei Doppelbindungen übertragbar sind.⁷⁷ Die erste Möglichkeit ging von der initialen Bildung des 15-Hydroperoxids der Arachidonsäure aus, welches nach α -Fragmentierungen zu der entsprechenden 14-Keto-5,8,11-triensäure überführt wurde. Die weitere Oxygenierung an Position 12 gefolgt von der α -Fragmentierung würde folglich MDA bilden. Der zweite postulierte Bildungsweg verlief über das 5-Hydroperoxid der Arachidonsäure, dessen weiterer Abbau zu einem Acrolein-Radikal führte und nach Reaktion mit einem Hydroxyl-Radikal MDA ergeben soll.⁷⁷ Die enzymatische Bildung von MDA erfolgte *in vitro* und in Zellkultur aus dem biogenen Amin Spermin über das intermediäre 3-Aminopropanal unter Beteiligung der Polyamin- und Diaminoxidase.¹³⁵ Daneben wird MDA als ein Nebenprodukt der Thromboxan-Synthase verstanden.¹³⁶ Im Zuge der Untersuchung der enzymatischen Oxidation von Fettsäuren und der Prostaglandinbildung nutzte Hamberg et al. eine mit Tritium markierte Eicosa-8,11,14-triensäure und konnte die Bildung von markiertem MDA im Bereich von C_9 - C_{11} sowie die Bildung der 12-Hydroxyheptadeca-8,10-diensäure als entsprechendes Gegenstück identifizieren.¹³⁷

Obwohl MDA eine etablierte Markersubstanz für die Lipidperoxidation darstellt, wurde sie auch im Kontext des photochemischen Kohlenhydratabbaus beschrieben. So wurde MDA in wässriger Lösung aus Glucose, Fructose oder Saccharose gebildet, wenn diese bestrahlt wurden. Die freigesetzte Menge korrelierte mit der eingesetzten Strahlendosis.¹³⁸ Mechanistisch betrachtet sollen Hydroxyl-Radikale für die Fragmentierung des Kohlenstoffgrundgerüsts unter Bildung von MDA verantwortlich sein.¹³⁹ Dieser Reaktionsweg könnte eine Bedeutung bei der Bestrahlung von zuckerhaltigen Lebensmitteln haben. Beispielsweise führte die ionisierende Bestrahlung von Apfelsaft zu einer dosisabhängigen Bildung von MDA.¹⁴⁰ Daneben wurde MDA aus 2-Desoxyzuckern gebildet, wenn diese unter definierten Bedingungen mit Periodat oxidiert wurden. Die nachfolgende Farbreaktion mit 2-Thiobarbitursäure (2-TBA) wurde von Waravdekar zur indirekten Quantifizierung der 2-Desoxyzucker analytisch genutzt.¹⁴¹ Die Bildung von MDA wurde auch ausgehend von 2-Desoxyzuckern unter Beteiligung von Hydroxyl-Radikalen und Metallionen beschrieben.^{142,143} Daneben soll MDA auch aus Acetaldehyd unter Beteiligung von Glucose, Fructose und Saccharose während des Erhitzens im sauren Milieu unter Anwesenheit von 2-TBA hervorgehen. Die mechanistischen Zusammenhänge sind hierbei jedoch unklar.¹⁴³

In einem Eisen-Ascorbat-Oxidationssystem bei 37°C korrelierte die Anzahl der Doppelbindungen der eingesetzten Fettsäuren (Docosahexaensäure, Arachidonsäure und Linolsäure) mit dem Gehalt an *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS).¹⁴⁴ Dies konnte auch direkt für MDA gezeigt werden. So gingen die molaren Ausbeuten von MDA in Modell-Oxidationen von Linolsäure (0,5%), γ -Linolensäure (4,9%), Arachidonsäure (4,7%) und Docosahexaensäure (7,6%) mit der Anzahl der Doppelbindungen einher, wobei dies auch in nachfolgenden Arbeiten bestätigt wurde.^{145,146} Diese Ergebnisse konnten auch auf thermische Inkubationen übertragen werden, bei denen im Vergleich zu Linolsäure um Faktoren von 5-14 (Arachidonsäure) bzw. 2-6 (Linolensäure) höhere Gehalte an MDA bestimmt wurden.¹⁴⁷

2.1.2.7 Quantifizierung von MDA

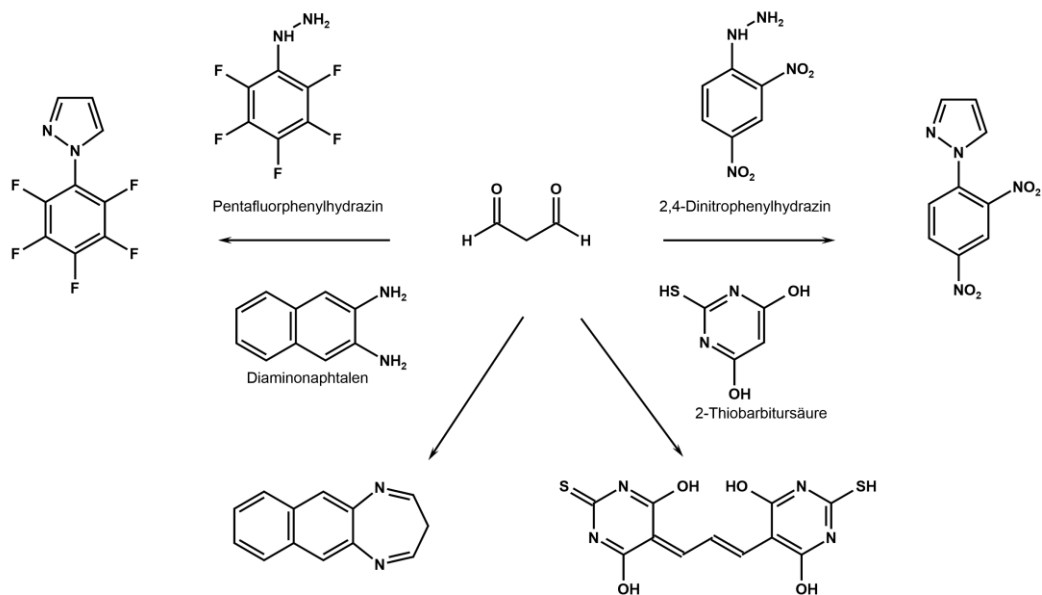


Abbildung 8: Darstellung verschiedener Derivatisierungsreaktionen für MDA.

Die Derivatisierung mittels 2-TBA stellt die wohl bekannteste Derivatisierungsstrategie zur quantitativen Bestimmung von MDA dar und ist auf eine Vielzahl von Matrices anwendbar (Abbildung 8). Hierbei kondensiert MDA unter sauren Reaktionsbedingungen mit zwei Molekülen 2-TBA zu einem pinken Chromophor, welches sowohl UV/VIS- ($\lambda_{\text{max}}=532 \text{ nm}$), als auch Fluoreszenz (FLD) -spektrometrisch ($\lambda_{\text{ex}}=525 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=560 \text{ nm}$) analysiert werden kann.^{148,149} Zeitgleich reagiert 2-TBA jedoch auch mit gesättigten Aldehyden unter Ausbildung von gelben Strukturen mit einem Absorptionsmaximum im Bereich von $\lambda_{\text{max}}=450 \text{ nm}$.¹⁵⁰ Daneben führten die Reaktionen von 2-TBA mit Alkanalen, 2-Alkenalen, 2,4-Alkadienalen, 4-Hydroxy-2-enalen, MGO und GO zu verschiedenen roten Pigmenten, welche mit dem Maximum des MDA-TBA₂-Komplexes ($\lambda_{\text{max}}=532 \text{ nm}$) interferierten.^{127,151–153} In Modellsystemen, die verschiedene Alkanale und 2-TBA enthielten, konnten zunächst farblose Verbindungen isoliert werden, welche oxidativ aus 2-TBA und den entsprechenden Alkanalen vermutlich durch Aldolkondensation und Cyclisierung gebildet wurden. Unter den Bedingungen des 2-TBA-Assays wurden diese in ein rotes Pigment umgewandelt, welches wie auch die entsprechenden Reaktionsprodukte von 2-Alkenalen nahezu identische spektroskopische, als auch chromatographische Eigenschaften wie der MDA-TBA₂-Komplex zeigten.^{154,155} Nachfolgende Untersuchungen mit 2,4-Hexadienal und 2-TBA verifizierten, dass es sich bei den ausgebildeten roten Pigmenten um MDA-TBA₂ handelte.¹⁵⁶ In verschiedenen Inkubationen von isolierten Aldehyden zeigte sich jedoch, dass der molare Extinktionskoeffizient der resultierenden 2-TBA-Addukte bei einer Wellenlänge von 532 nm um Größenordnungen (10^2 - 10^3) kleiner im Vergleich zu MDA-TBA₂ war.^{127,151–153} Aufgrund der genannten Nebenreaktionen wird das Ergebnis einer reinen photometrischen Messung nach Derivatisierung einer Probe mit 2-TBA als TBARS bezeichnet, während für eine

spezifische Analytik von MDA eine vorherige chromatographische Abtrennung der Nebenprodukte nötig ist. Der Methodenvergleich von TBARS gegenüber MDA war Gegenstand zahlreicher Studien und spiegelte im Grunde das relative Verhältnis von MDA zu weiteren Matrixsubstanzen wider, welche ebenfalls mit 2-TBA reagierten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass beide Methoden äquivalent waren,¹⁴⁹ jedoch konnten in den meisten der untersuchten Matrices nur ein Teil der TBARS auf MDA zurückgeführt werden.¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ Eine Quantifizierung von MDA mittels UV-Assay erfordert somit für jede Matrix eine vorausgehende Validierung mithilfe chromatographischer Referenzmethoden. Unabhängig von der gewählten Analysemethode kann die Hydrolyse von kovalent gebundenem MDA während der Probenaufarbeitung zu einer Überschätzung der quantifizierten Menge an MDA führen. Dies spielt insbesondere unter sauren Reaktionsbedingungen, bei denen die Proben in Anwesenheit von Proteinen und Lipiden erhitzt werden, eine Rolle. Die Hydrolyse von proteingebundenem MDA könnte auch die Variationen der freien MDA-Konzentrationen in Plasma zwischen verschiedenen Studien erklären (Tabelle 5). Nachfolgende Untersuchungen differenzierten dann grundsätzlich zwischen dem freien und gebundenen Anteil von MDA, wobei bei Letzteren die Proben gezielt sauer oder alkalisch hydrolysiert wurden. Systematische Untersuchungen zeigten beispielsweise, dass in Plasmaproben 90% des alkalisch hydrolysierbaren MDAs aus Proteinen stammte, während der Rest auf die Lipidfraktion zurückzuführen war.¹⁶¹ Im Vergleich zum freien MDA, liegt der Anteil des gebundenen MDAs je nach Studie zwischen 64-99%, wobei die große Variation durch unterschiedliche Hydrolyse-Bedingungen begründet wurden.¹⁶¹⁻¹⁶⁷ Der hohe Anteil des gebundenen MDAs gibt hierbei einen Hinweis auf den Modifikationsgrad von Plasmaproteinen durch MDA, jedoch ist über die beteiligten Aminosäuren und ausgebildeten Strukturelemente wenig bekannt (Kapitel 2.4.2).

Für die Derivatisierung von MDA sind neben 2-TBA zahlreiche weitere Möglichkeiten in der Literatur beschrieben, welche allgemein unspezifisch Carbonylverbindungen erfassen und somit stets in Verbindung mit chromatographischen Kopplungen genutzt wurden (Abbildung 8). Die Derivatisierung von Aldehyden mittels DNPH führt zu stabilen Hydrazonen oder Pyrrolen, welche nach flüssigchromatographischer Trennung mittels UV- oder massenspektrometrischer Detektion erfasst werden können.^{161,168} Weiterhin wurde MDA in Plasmaproben durch die Derivatisierung mit Fluorenylmethoxycarbonyl-Hydrazin (Fmoc-Hydrazin) oder Diaminonaphtalen (DAN) mittels HPLC gekoppelt mit Fluoreszenz-Detektor (HPLC-FLD) bzw. Diodenarray-Detektor (HPLC-DAD) quantifiziert.^{162,163} Eine gaschromatographische Analyse von MDA ist nach einer Derivatisierung unter milden Bedingungen (25-50°C) mittels Phenylhydrazin (PH), Pentafluorphenylhydrazin, 2,4,6-Trichlorophenylhydrazin oder 2-Hydrazinbenzothiazol beschrieben. Die Quantifizierung der gebildeten Pyrazole kann hierbei unter Verwendung eines

Elektroneneinfang- Stickstoffphosphor- oder Massenspektrometrischen-Detektors erfolgen.^{169–172} Alternativ hierzu kann MDA auch unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen durch O-(2,3,4,5,6-Pentafluorbenzyl)hydroxylamin oder Pentafluorbenzylbromid in die entsprechenden flüchtigen Oxim- bzw. Pentafluorbenzyl-Derivate überführt werden.^{173,174}

Tabelle 5: Konzentrationen des freien sowie gebundenen MDAs in Plasmaproben von gesunden Probanden.

Analytik	Derivatisierung	Hydrolysebedingung	Freies MDA [μM] / [Anteil% ¹]	Gesamt-MDA [μM]	Literatur
saure Hydrolyse					
HPLC-FLD	2-TBA	0,29 M H ₃ PO ₄ , 60 min	n.b.	0,69	175
HPLC-FLD	Fmoc-Hydrazin	0,18 M H ₂ SO ₄ , 60 min, Raumtemperatur	0,15 / (36%)	0,43	162
HPLC-DAD	DAN	pH 0,8, 37°C, 180 min, DAN	0,02 / (15%)	0,16	163
alkalische Hydrolyse					
GC-MS	PH	0,5 M NaOH, 60°C, 30 min	0,14 / (23%)	0,6	164
GC-MS	PH	1 M NaOH, 60°C, 60 min	0,14 / (11%)	1,3	164
GC-MS	PH	1 M NaOH, 60°C, 60 min	0,45 / (26%)	1,70	165
HPLC-UV	2-TBA	0,5 M NaOH, 60°C, 30 min	0,04 / (11%)	0,43	166
HPLC-UV	2-TBA	0,4 M NaOH, 60°C, 30 min	0,07 / (5%)	1,45	167
UHPLC- HRMS ²	DNPH	1 M NaOH, 60°C, 30 min	0,12 / (2%)	6,7	161
HPLC-UV	DNPH	1 M NaOH, 60°C, 30 min	n.b.	2,2	168
HPLC-UV	DNPH	1 M NaOH, 60°C, 60 min	n.b.	13,8	176

¹prozentualer Anteil des freien MDA bezogen auf Gesamt-MDA, ²Ultra-Hochleistungsflüssigchromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie

Die Bildungen von MDA sowie von weiteren sekundären Produkten der Lipidperoxidation wurden auch in Lebensmitteln und Speiseölen untersucht.^{177–180} Papastergiadis et al. quantifizierte MDA, 4-HNE und 4-HHE in einer Reihe von Speiseölen, Nüssen, Fleisch-, Fisch- sowie frittierten Produkten, wobei MDA die Gehalte von 4-HNE und 4-HHE deutlich überstieg.¹⁷⁷ Die höchsten Konzentrationen wurden für alle freien Aldehyde in rohen und gepökelten Fleischprodukten sowie Nüssen nachgewiesen (Tabelle 6). In prozessierten Fleischprodukten lagen die Konzentrationen hingegen um Faktoren von 5-16 niedriger. Dies könnte durch Folgereaktionen der Aldehyde mit Proteinen bei höheren Temperaturen erklärt werden.¹⁷⁸ Offensichtlich überstiegen Abbaureaktionen während der Prozessierung die Neubildungen. So zeigte Globisch et al., eine sechsfache Zunahme der Konzentration von 4-HNE beim Erhitzen von purem Erdnussöl, während in Erdnüssen die Konzentration von 4-HNE nach gleicher Röstzeit und Temperatur um etwa 80% abnahm.¹⁷⁸ Die Analytik von freien Aldehyden berücksichtigt somit grundsätzlich keine Reaktivitätsunterschiede und das damit verbundene individuelle Verhältnis von freier und an Makromolekül gebundener Form von Aldehyden.

Tabelle 6: Konzentrationen von MDA, 4-HNE und 4-HHE in verschiedenen Lebensmitteln und Ölen.

Matrix	Bedingungen	MDA	4-HNE	4-HHE	Literatur
Fleischprodukte	roh	1,6	0,5	0,05	
Fleischprodukte	zubereitet	0,1	0,1	0,005	177
Nüsse		1,6	0,3	0,008	
Pflanzenöle		0,08	0,04	0,02	
Erdnussöl	170°C, 20-40 min	n.b.	0,2-1,0	n.b.	178
Leinöl	60°C, 12 Tage	1,3	2,7	9,7	179
Leinöl	60°C, 24 Tage	2,0	8,0	43,5	
Leinöl	180°C, 5 h	5,8	2,8	6,0	180

2.2 Bildung von Aromakomponenten

Beim Strecker-Abbau werden α -Aminosäuren unter Beteiligung von 1,2-Dicarbonylen nach Decarboxylierung und Deaminierung in aromapotenten Aldehyden überführt, welche einen wichtigen Beitrag zu den sensorischen Eigenschaften von prozessierten Lebensmitteln einnehmen (Abbildung 9). Die zeitgleich gebildeten 1-Amino-2-carbonyl-Strukturen ergeben nach weiterer Kondensation verschiedene heterocyclische Alkylpyrazine, welche ebenfalls potente Aromakomponenten in prozessierten Lebensmitteln darstellen.¹⁸¹ Hidalgo et al. zeigte anhand von 4,5-Epoxy-2-alkenalen einen Abbauweg von Phenylalanin bei 37°C, der im Ergebnis zu dem entsprechenden Streckeraldehyd führte. Als Konkurrenzreaktionen hierzu bilden 4,5-Epoxy-2-alkenale mit Amin-Verbindungen jedoch auch *N*-substituierte Pyrrole sowie 2-(1-Hydroxyalkyl)-Pyrrole aus (Abbildung 23).¹⁸²

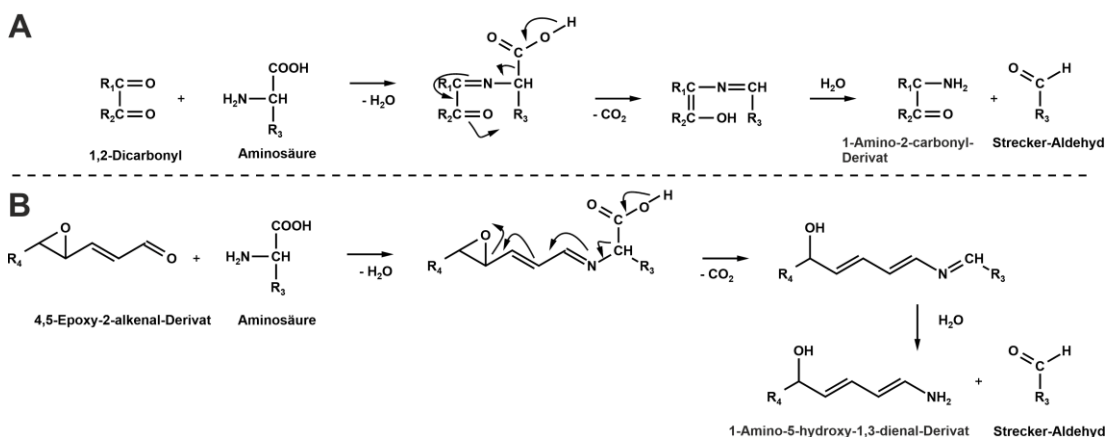


Abbildung 9: Strecker-Abbau von Aminosäuren durch 1,2-Dicarbonyle (A). Abbaumechanismus von Aminosäuren durch 4,5-Epoxy-2-alkenalen unter Bildung von Strecker-Aldehyden (B).

2.3 Bildungswege von Advanced Glycation End Products

Wie bereits beschrieben bezeichnen AGEs stabile Proteinmodifikationen, welche aus dem Abbau von Kohlenhydraten stammen. In Analogie werden respektive Produkte aus der Lipidperoxidation oftmals als ALEs bezeichnet.^{7,183} Grundsätzlich gibt es Proteinmodifikationen, die spezifisch dem Abbau von Kohlenhydraten oder Lipiden zugeordnet werden können, jedoch ist eine klare Abtrennung nicht immer möglich. Beispielsweise lassen sich GO und MGO gleichermaßen durch die Fragmentierung von Kohlenhydraten als auch Lipiden erklären. Gerade im Hinblick auf die Analogien der Grundstrukturen und Bildungsmechanismen der ausgebildeten Proteinmodifikationen, sollten beide Reaktionswege in Lebensmitteln gleichermaßen betrachtet werden.⁷ Die Einteilung von nicht-enzymatischen Proteinmodifikationen kann aufgrund der beteiligten Aminosäuren und der ausgebildeten Strukturelemente sowie aufgrund der mechanistischen Zusammenhänge von Vorläuferstrukturen und Folgereaktionen erfolgen. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lassen sich nicht-enzymatische Proteinmodifikationen im Wesentlichen durch drei grundlegende Mechanismen formulieren: (I) Kondensation von Carbonylverbindungen mit Protein-Seitenketten und anschließende Isomerisierungen, Cyclisierungen und/oder Oxidationen zu stabilen Produkten.^{6,12} (II) (Oxidative) Fragmentierung von Polyhydroxycarbonylverbindungen unter Beteiligung von Amin-Komponenten.⁴¹ (III) Direkte Übertragung von Acyl-Resten auf Protein-Seitenketten durch aktivierte Carbonsäurederivate.¹⁸⁴ In komplexen Matrices laufen diese Reaktionen für einzelne Proteinmodifikationen auch parallel ab, wobei dies die Interpretation der mechanistischen Zusammenhänge erschwert. Die umfassende Analytik des Produktspektrums innerhalb einer Bildungskaskade sowie der Abgleich der relativen Konzentrationsverhältnisse gegenüber Modellinkubationen eröffnet jedoch eine Möglichkeit, die quantitativ bedeutendsten Reaktionswege in einem entsprechenden Lebensmittel abzuschätzen. Die grundlegenden Bildungsmechanismen von AGEs bzw. ALEs werden folgend anhand ausgewählter Beispiele dargestellt.

2.3.1 Fragmentierungsreaktionen

Von einem modernen Verständnis her ist die β -Fragmentierung (Abbildung 10) sowie in geringerem Maße die oxidative α -Spaltung für die Bildung von AGEs von Bedeutung. Beide Reaktionswege führen zu kurzkettigen Carbonsäuren, welche als mengenmäßig bedeutende und stabile Endprodukte der Maillard-Reaktion verstanden sind.^{185,186} Während beide Fragmentierungswege grundsätzlich über einen Hydrolyse-Mechanismus verlaufen, bewies Smuda et al., dass sowohl die β -Fragmentierung als auch die oxidative α -Spaltung zusätzlich amininduziert zur Ausbildung von respektiven Amid-AGEs führen.⁴¹ Dies hatte eine fundamentale Bedeutung für das Verständnis der Bildung von Amid-AGEs direkt aus Fragmentierungsreaktionen innerhalb der Kohlenstoffgerüste von reduzierenden Zuckern.¹¹

2.3.1.1 Amininduzierte β -Fragmentierung

Smuda et al. etablierte den Mechanismus der amininduzierten β -Fragmentierung anhand von Inkubationsversuchen mit 1-DG.¹¹ Dieses isomerisiert zunächst entlang des Kohlenstoffskeletts zu den entsprechenden 1-Desoxy- β -Dicarbonylverbindungen. Die nachfolgende β -Fragmentierung der verschiedenen Isomere erklärt dann die respektiven Amid-AGEs N^6 -Acetyllysin, N^6 -Glycerinlysin, N^6 -Lactoyllysin und N^6 -Formyllysin. Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass dieser Fragmentierungsmechanismus auch auf die Dehydroascorbinsäure übertragbar ist. So führt die Fragmentierung der 2,4-Diketogulonsäure unter physiologischen Bedingungen zu N^6 -Oxalyllysin sowie Erythrose als Nebenprodukt (Abbildung 10).¹⁸⁷

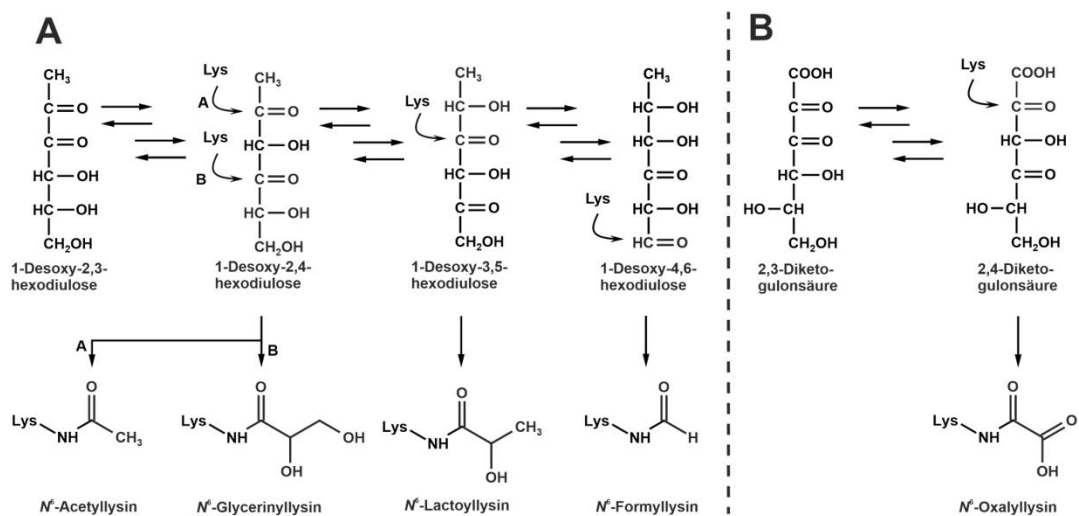


Abbildung 10: Bildung von Amid-AGEs im Zuge der amininduzierten β -Fragmentierung von 1-Desoxyglucoson (A) bzw. Dihydroascorbinsäure (B).

2.3.1.3 Oxidative α -Spaltung

Am Beispiel der Fragmentierung der 2,3-Diketogulonsäure wird die Bildung von Amid-AGEs verdeutlicht (Abbildung 11). So führt die amininduzierte oxidative α -Spaltung zu N^6 -Oxalyllysin und N^6 -Threonyllysin, wobei letztere eine für die Ascorbinsäure charakteristische Marker-Struktur darstellt. Dies ermöglichte erstmalig den spezifischen Einfluss der Ascorbinsäure in Gegenwart von reduzierenden Zuckern auf die Modifikation von Proteinen zu bewerten.¹⁸⁷ Daneben führte eine Decarboxylierung und anschließende Isomerisierung zu 2,3-Xylodiulose, welche zu N^6 -Glykoyllysin (GALA) und N^6 -Glycerinlysin fragmentierte.¹⁸⁷

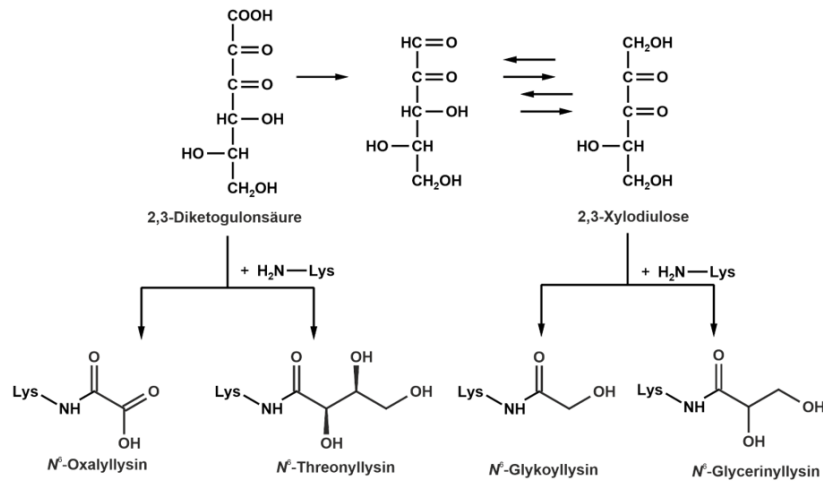


Abbildung 11: Bildung von Amid-AGEs durch die amininduzierte α -Spaltung der 2,3-Diketoglucosäure und 2,3-Xylodiolose.

2.3.1.4 Bildung von stabilen Proteinmodifikationen aus Amadori-Produkten

Die oxidative Spaltung des Amadori-Produkts führt gleichermaßen zur Bildung von CML und Erythronsäure als Nebenprodukt (Abbildung 12).^{188,189} Erfolgt eine weitere Addition von Lysin an die freie Carbonylgruppe des Amadori-Produkts kann in Analogie die Bildung von *glyoxal lysine amide* (GOLA) erklärt werden.¹²

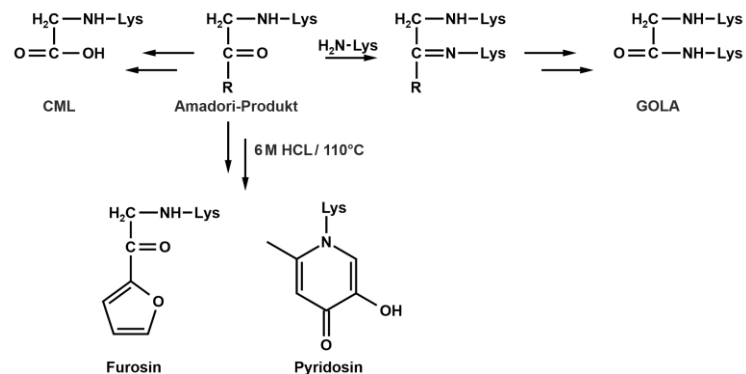


Abbildung 12: Bildung von AGEs durch die Fragmentierungen von Amadori-Produkten.

Im Gegensatz hierzu wird Furosine direkt aus Amadori-Produkten während der sauren Proteinhydrolyse (6 M HCl, 110°C) gebildet und kann als eine indirekte Marker-Struktur für die Anfangsphase der Maillard-Reaktion herangezogen werden (Abbildung 12). Die Ausbeuten waren in Modelluntersuchungen von den Hydrolyse-Bedingungen sowie den entsprechenden eingesetzten Amadori-Produkten abhängig und lagen im Bereich von ca. 30-50%.¹⁹⁰ Über einen empirisch ermittelten Korrekturfaktor ist es möglich, über Furosine auf die Konzentration der Amadori-Produkte rückzuschließen.¹⁹⁰ Als weiteres Nebenprodukt wird Pyridosine gebildet.¹⁹⁰

2.3.2 Acylierung durch aktivierte Acyl-Carbonylverbindungen

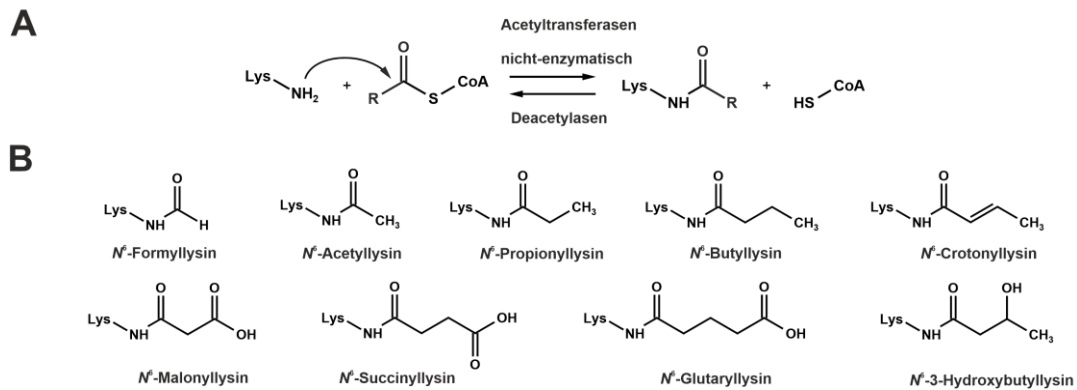


Abbildung 13: Mechanismus der enzymatischen und nicht-enzymatischen Acylierung von Lysin (A) und Darstellung ausgewählter Amid-AGEs (B).

Die Acetylierung von Histon-Proteinen durch Acetyl-Coenzym A (CoA) hat einen entscheidenden Einfluss auf die Chromatinstruktur sowie Genexpression.^{191,192} Die Acetylierung von Lysin wird *in vivo* enzymatisch durch Acetyltransferasen katalysiert (Abbildung 13).¹⁹³ Fortschritte in den massenspektrometrischen Analysemethoden ermöglichten die Identifizierung einer Reihe von weiteren Histon-Modifikationen, während für die Breite dieser neuartigen Lysin-Acylierungen ein enzymatischer Bildungsmechanismus zunächst unbekannt war.^{184,194} Dies brachte die Suche nach alternativen Bildungswegen mit sich. Ausgehend von Inkubationsversuchen mit Lysin, Peptiden, Proteinen und den respektiven CoA-Thioestern konnte die Hypothese eines zusätzlichen nicht-enzymatischen Bildungswegs in zahlreichen Modellsystemen bewiesen werden. Beispielsweise führte die nicht-enzymatische Reaktion von Lysin mit Acetyl-, Propionyl-, Butyryl-, Crotonyl-, Malonyl-, Succinyl-, Glutaryl- und β -Hydroxybutyryl-CoA *in vitro* zu den entsprechenden stabilen Lysin-Acylierungen (Abbildung 13).^{195–198} Die Ausbeuten korrelierten hierbei mit einem steigenden pH-Wert, welcher mit dem zunehmenden Anteil von deprotonierten und somit reaktiven N^6 -Aminogruppen von Lysin einhergeht.^{195,196} Dieser nicht-enzymatische Acylierungsmechanismus könnte *in vivo* in besonderem Maße in Mitochondrien relevant sein, welche im Vergleich zu den übrigen zellulären Organellen einen physiologisch bedingten höheren pH-Wert von ca. 8 sowie relativ hohe endogen vorhandene Konzentrationen von Acyl-CoA Thioester haben. Beispielsweise sind für Acetyl-CoA Konzentrationen im Bereich von 0,1–1,5 mM beschrieben.¹⁹⁶ Hinsichtlich der nicht-enzymatischen Acylierung nahmen Succinyl-CoA und Glutaryl-CoA innerhalb der bisher in der Literatur beschriebenen Acyl-CoA Thioester eine Sonderstellung ein und zeigten besonders hohe Reaktivitäten. Dies ließ sich mechanistisch jeweils auf die intramolekulare Kondensation unter Bildung eines intermediären cyclischen Anhydrids zurückführen, welches die Reaktivität des entsprechenden Thioesters nochmals überstieg.^{195,198} Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind eine Vielzahl von CoA-Thioestern als Schlüsselintermediate für biologische Prozesse, wie

beispielsweise im Metabolismus von Aminosäuren, Lipiden und im Citratzyklus bekannt.¹⁹⁹ Die nicht-enzymatische Acylierung ist nicht auf die entsprechenden Acyl-CoA Thioester begrenzt und kann grundsätzlich auch durch andere aktivierte Carbonylverbindungen erfolgen. So kann die Bildung von *N*⁶-Acetyllysin sowohl durch S-Acetylglutathion als auch durch Acetyl-Phosphat, welches eine wichtige Donorsubstanz für die Acetylierung in Bakterien darstellt, erklärt werden.²⁰⁰⁻²⁰² Von einer modernen Sichtweise aus wird das Spektrum an bekannten Lysin-Acylierungen *in vivo* sowohl durch enzymatische als auch nicht-enzymatische Reaktionswege abgebildet.¹⁸⁴ Die Identifikation von neuartigen Lysin-Acylierungen in verschiedenen Matrices trägt fortlaufend zu einem besseren Verständnis der allgemeinen Bedeutung dieses Bildungsmechanismus bei. Beispielsweise konnten die in Abbildung 13 gezeigten Lysin-Modifikationen massenspektrometrisch in Organen von Mäusen nachgewiesen und quantifiziert werden, wobei *N*⁶-Acetyllysin und *N*⁶-Formyllysin die bedeutendsten Acylierungen darstellten.²⁰³ Nachfolgende Arbeiten zeigten, dass die Gehalte von *N*⁶-Formyllysin, *N*⁶-Propionyllysin, *N*⁶-Butyryllysin und *N*⁶-Succinyllysin in cytosolischen- sowie Histon-Proteinen auch mit dem Alter zunahmten.³²

In physiologischen Systemen erfolgt die Regulation der Lysin-Acylierung durch eine Reihe von Histondeacetylasen (HDAC), welche anhand ihres Cofaktors in die Zn²⁺-abhängigen HDAC der Klasse I, II und IV (HDAC 1-11) und Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-abhängige Klasse III (Sirtuine, SIRT 1-7) unterteilt werden.^{199,204} Entgegen des historisch gewachsenen Namens umfasst das Substratspektrum der HDAC jedoch neben der Acetylierung nahezu die gesamte Breite der bisher bekannten Lysin-Acylierungen und ist auch nicht auf Histon-Proteine begrenzt. Innerhalb der Unterklassen gibt es hingegen eine Abgrenzung hinsichtlich des Substratspektrums als auch der zellulären Lokalisation der individuellen Deacetylasen. Beispielsweise sind in Mitochondrien bei Säugetieren SIRT3, SIRT4 und SIRT5 vorhanden. Die Acetylierung wird überwiegend durch SIRT3 reguliert während SIRT5 nur eine schwache Deacetylase-Aktivität zeigt, jedoch effektiv die Abspaltung der sauren Modifikationen *N*⁶-Malonyllysin, *N*⁶-Succinyllysin und *N*⁶-Glutaryllysin katalysiert.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Neue Erkenntnisse erweitern fortlaufend das Verständnis um die Substratspezifität der HDAC. Beispielsweise wird auch die Deacylierung von *N*⁶-Lactoyllysin oder *N*⁶-Pyruvoyllysin, welche aus MGO und Lysin gebildet werden (Abbildung 14), durch Sirtuine bzw. HDAC katalysiert.^{208,209} Insgesamt kommt diesem enzymatischen Deacylierungsmechanismus eine große Bedeutung hinsichtlich der Integrität von Proteinfunktionalitäten *in vivo* bei.²⁰⁴ Insbesondere bei der Zubereitung von Lebensmitteln, bei dem dieser Deacylierungsmechanismus durch Denaturierungseffekte verhindert wird, könnten endogen vorhandene reaktive Acyl-Thioester nicht-enzymatisch und irreversibel mit Proteinen kondensieren.

2.3.3 Isomerisierungs- und Cyclisierungsreaktionen

Für die Bildungen von AGEs sind Reaktionen der Protein-Seitenketten von Lysin und Arginin mit GO sowie MGO von besonderer Bedeutung. Daneben gehen auch die nucleophilen Protein-Seitenketten von Cystein oder Histidin Reaktionen mit Carbonylverbindungen und reduzierenden Zuckern ein.^{210–212} Die entsprechenden Reaktionsprodukte von Histidin und Cystein sind strukturell nicht abschließend aufgeklärt und die quantitative Bedeutung dieser Proteinmodifikationen wenig erforscht. In Lebensmitteln werden die Reaktionen noch komplexer, da eine breite Klasse an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, Vitaminen, freien (nicht)-proteinogenen Aminosäuren und Peptiden ebenfalls mit 1,2-Dicarbonylen reagieren. Der gezielte Einsatz dieser Strukturen zum Abfangen von 1,2-Dicarbonylverbindungen unter Erhalt der Integrität der nativen Proteinstrukturen stellt hierbei ein aktuelles Forschungsfeld dar.^{213–217}

Die bisher bekannten stabilen Proteinmodifikationen, welche sich aus den Reaktionen von GO und MGO mit Lysin- und Arginin-Seitenketten der Proteine ergeben, werden in Abbildung 14 dargestellt. GO kondensiert mit Arginin zunächst unter Bildung eines kinetisch kontrollierten Dihydroxyimidazolinons, welches unter Ringöffnung langsam in die einzige stabile und offenkettige Struktur *N*⁷-Carboxymethylarginin (CMA) hydrolysiert. Beide Strukturen werden jedoch unter stark sauren Bedingungen in Glyoxal-Hydroimidazol 3 (G-H3) überführt, welches als ein Summenparameter für CMA und Dihydroxyimidazolinons analytisch genutzt wird.⁸ Die Reaktion von MGO ist deutlich komplexer und die strukturell analoge Struktur *N*⁷-Carboxyethylarginin (CEA) stellt ein Intermediat zwischen dem zunächst gebildeten und kinetisch kontrollierten endocyclischen Methylglyoxal-Hydroimidazol 3 (MG-H3) und der thermodynamisch stabilen exocyclischen Struktur Methylglyoxal-Hydroimidazol 1 (MG-H1) dar (Abbildung 14).^{13,218,219} Innerhalb dieses Reaktionsschemas wurden zusätzlich Argpyrimidin und Tetrahydropyrimidin identifiziert, welche mechanistisch ausgehend von MG-H3 unter Implementierung von weiteren MGO zurückgeführt wurden.^{13,220,221} Die Reaktion von GO mit Lysin führt zu einem GO-Imin, welches nach Reduktion mittels Natriumborhydrid (NaBH₄) indirekt über das gebildete *N*⁶-Hydroxyethyllysin quantifiziert werden kann.³⁵ Ausgehend von diesem GO-Imin, lässt sich die Bildung von CML durch die weitere Addition von Wasser unter Bildung eines Hydrates und anschließender Umlagerung zu der entsprechenden Carbonsäure erklären. Diese intramolekulare Redoxreaktion ähnelt im Ergebnis einer Cannizzaro-Reaktion, bei der ein Hydrid-Ion übertragen wird.¹² Innerhalb dieser sogenannten CML-Isomerisierungskaskade kann auch die Bildung der Amid-Struktur GALA über ein intermediäres Halbaminall formuliert werden, welches alternativ nach Oxidation zu *N*⁶-Glyoxyllysin führt.¹⁰

Analog zu diesem Reaktionsmechanismus führen die Reaktionen von weiteren Aminosäuren zur Ausbildung von quervernetzenden Proteinmodifikationen, welche auch als

Beispielsweise sind in Teilen die entsprechenden Isomerisierungsprodukte auch für langkettige 1,2-Dicarbonylverbindungen bekannt. So lassen sich die Bildungen von *3-deoxyglucosone-derived imidazoline crosslink* (DODIC), 3-Desoxyglucoson-Hydroimidazolone 1 (3-DG-H1) und *3-deoxyglucosone lysine dimer* (DOLD) direkt aus den Reaktionen von Arginin bzw. Lysin mit 3-DG formulieren.^{225–227} Weiterführende Untersuchungen identifizierten vier weitere AGEs mit einem Imidazolinon-Grundkörper, welche aus Desoxyosen von Pentosen, als auch aus Fragmentierungs-Produkten der L-Dehydroascorbinsäure gebildet wurden.^{226,228} Diese langkettigen Imidazolinon-Derivate können oxidativ unter Ausbildung von fünf- oder sechsgliedrigen Spiro-Verbindungen intramolekular kondensieren, welchen in physiologischen Systemen jedoch kaum Bedeutung zugeschrieben wurden.^{229,230} Weitere quantitativ bedeutende Strukturen stellen hingegen Hydroxymethylfurfural (HMF) sowie die entsprechende Lysin-Analoge Struktur Pyrralin dar, welche sich aus 3-DG ergeben. HMF wird säurekatalysiert aus verschiedenen Hexosen nach Dehydratisierung sowie Cyclisierung gebildet und dient als ein Qualitätsparameter z.B. in Honig oder Fruchtsäften.^{231,232} Die Pendants aus 3-Desoxypentosen (3-DP) stellen Formylin und Furfural dar (Abbildung 15).²³³

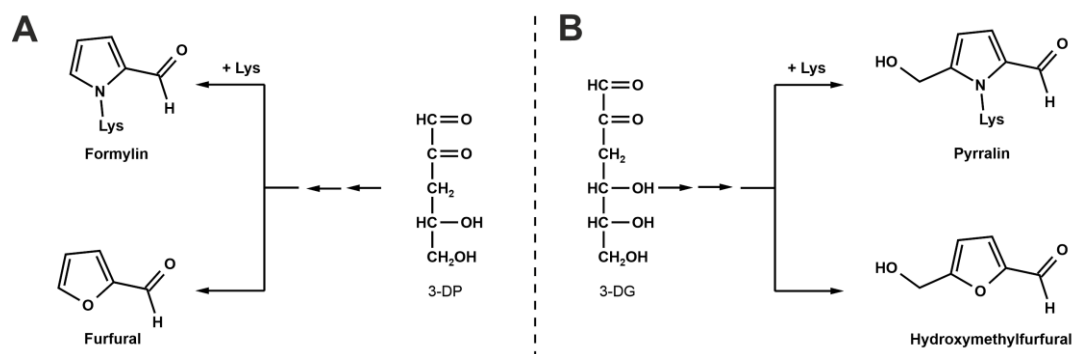


Abbildung 15: Bildungen von Pyrralin, Hydroxymethylfurfural, Furfural und Formylin aus den Reaktionen von 3-Desoxyzuckern mit und ohne Beteiligung von Lysin.

In vitro wurde die weitere Verknüpfung der Hydroxymethylenfunktion von Pyrralin mit Nucleophilen unter Ausbildung von quervernetzenden Ether- und Thioethergruppen beschrieben. Über eine Relevanz entsprechender *crosslink*-AGEs ist jedoch nichts bekannt.²³⁴

Aus den Amadori-Produkten von Hexosen und Pentosen lassen sich die Bildungen der *crosslink*-AGEs Glucosepan und Pentosidin erklären (Abbildung 16).^{6,235} Durch Dehydratisierungen und nachfolgende Isomerisierungen innerhalb der Kohlenstoffskelette werden die respektiven Lederer's Glucosone bzw. Pentosone gebildet, welche nach einer intramolekularen Cyclisierung eine Aldimin-Partialstruktur ausbilden können. Diese heteroanalogen 1,2-Dicarbonylverbindungen können folgend mit Arginin unter Ausbildung von bicyclischen Strukturen kondensieren. Zur Ausbildung der aromatischen und fluoreszierenden AGE-Modifikationen Pentosidin sind hingegen zusätzliche

Dehydratisierungen sowie eine Oxidation nötig.^{6,226,236} Die ebenfalls fluoreszierende Verbindung Vesperlysin A, welches auch unter LM1 bekannt ist, stellt prinzipiell ein strukturelles Pendant zu Pentosidin unter Beteiligung von zwei Lysin-Resten dar. Über den Reaktionsmechanismus ist wenig bekannt, jedoch wird die Beteiligung der Ascorbinsäure, Hexosen, Pentosen, Tetrosen sowie verschiedener kurzkettiger Carbonyl-Strukturen kontrovers diskutiert.^{237–239}

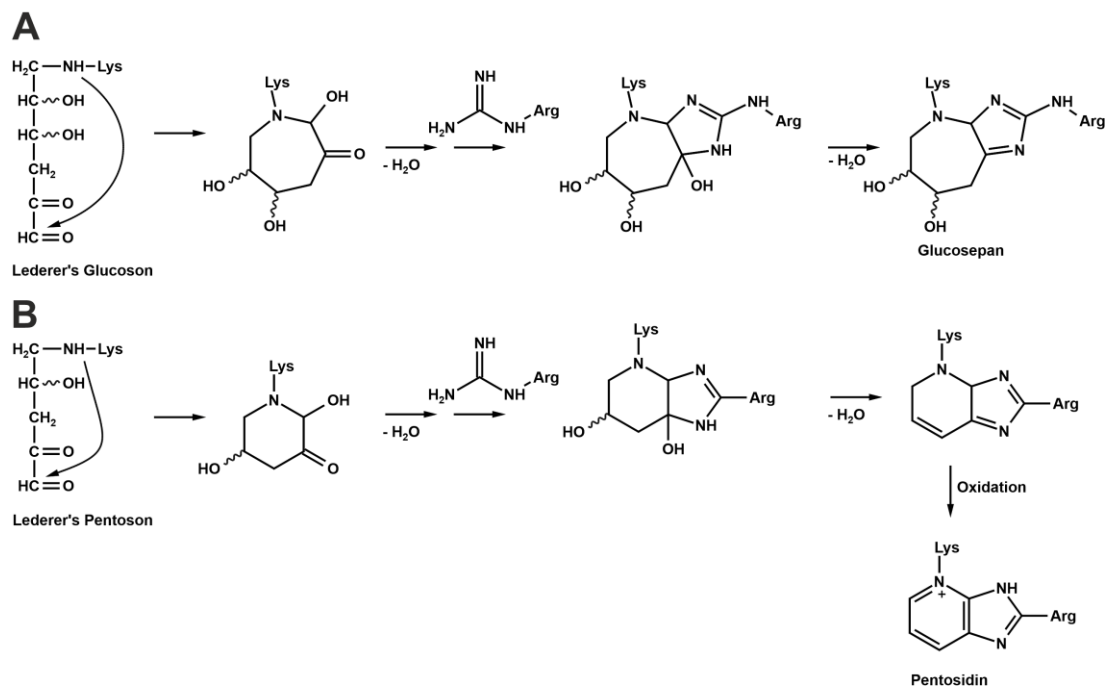


Abbildung 16: Bildung von Glucosepan aus dem Lederer's Glucoson (A) bzw. Pentosidin aus dem Lederer's Pentoson (B).

2.4 Bildung von Advanced Lipoxidation End Products

2.4.1 Bildung von Amid-Proteinmodifikationen

Im Zuge der Lipidperoxidation wurden zwei grundsätzlich verschiedene Reaktionsmechanismen für die Bildung von Amid-Proteinmodifikationen postuliert. Jedoch können Hydroperoxide in beiden Reaktionswegen Schlüsselintermediate darstellen.²⁴⁰ Neben den metallkatalysierten Fragmentierungsreaktionen von Hydroperoxiden unter Beteiligung von Amin-Verbindungen, können auch kurzkettige Aldehyde direkt mit Aminen unter Ausbildung von Schiffischen Basen kondensieren und folgend zu stabilen Amid-Strukturen oxidiert werden.^{241,242}

2.4.1.1 Bildung von Amid-Proteinmodifikationen direkt aus der Fragmentierung von Hydroperoxiden

In Inkubationen von Linolsäure, Docosahexaensäure und Arachidonsäure mit Pyridoxamin konnten zunächst entsprechende Succinyl-, Azelainyl-, Hexanonyl-, Formyl- sowie Glutaryl-modifizierte Pyridoxamin-Strukturen identifiziert werden.^{144,243,244} Am Beispiel der Linolsäure wurde ein Reaktionsmechanismus postuliert, der die Bildung des entsprechenden Hexanoyl-

Pyridoxamins und Azelainyl-Pyridoxamins aus 13-HPODE bzw. 9-HPODE erklärte (Abbildung 17).²⁴³ Während ein mechanistischer Beweis für diesen Bildungsweg fehlte, konnte Kato et al. aus einer Modellreaktion, die ein N^2 -blockiertes Lysin-Derivat sowie 13-HPODE enthielt, auch N^6 -Hexanoyllysin nachweisen.²⁴¹ Nachfolgende Inkubationen verschiedener Fettsäuren mit Lysin-Derivaten sowie Proteinen verifizierten N^6 -Propionyllysin und N^6 -Hexanoyllysin als Marker-Strukturen für die Oxidationen von Omega-3- bzw. Omega-6-Fettsäuren. Die Bildungen von N^6 -Succinyllysin, N^6 -Glutaryllysin und N^6 -Azelainlysin wurden hingegen ausgehend von den Fragmentierungen unter Beteiligung des carboxyterminalen Teils erklärt und diese ALEs sind somit den GOFAs zuzuordnen (Tabelle 7).²⁴⁵ Darüber hinaus ging aus einer Inkubation von Phosphatidylethanolamin mit 13-HPODE das entsprechende N -Hexanoylethanolamin-Derivat hervor, welches auch in oxidierten LDL indirekt nach enzymatischer Hydrolyse massenspektrometrisch quantifiziert werden konnte.²⁴⁶

Tabelle 7: Bildung von Amid-AGEs in Oxidations-Modellsystemen von ungesättigten Fettsäuren.

Modifikation	beteiligte Fettsäuren	Literatur
N^6 -Propionyllysin	Docosahexaensäure, Eicosapentaensäure	247
N^6 -Hexanoyllysin	Linolsäure, Arachidonsäure	247
N^6 -Succinyllysin	Docosahexaensäure	144,245
N^6 -Glutaryllysin	Eicosapentaensäure, Arachidonsäure	245
N^6 -Azelainlysin	Linolsäure	245

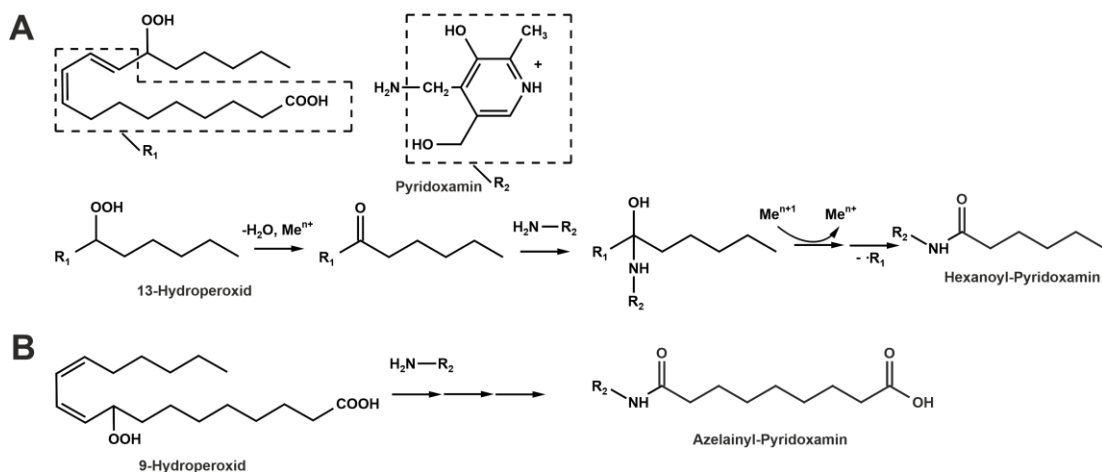


Abbildung 17: Postulierter Bildungsmechanismus von stabilen Amid-Strukturen aus Pyridoxamin und 13-Hydroperoxid (A) bzw. 9-Hydroperoxid (B) der Linolsäure.

2.4.1.2 Bildung von Amid-Strukturen aus Alkanalen

In nachfolgenden Untersuchungen von Ishino et al. wurde für N^6 -Hexanoyllysin ein zusätzlicher oxidativer Bildungsmechanismus unter direkter Beteiligung von Hexanal postuliert, welches zunächst reversibel zur Schiffsbases Base reagierte. Die Oxidation zur stabilen Amidstruktur N^6 -Hexanoyllysin erfolgte direkt durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Abbildung 18).²⁴² Dieser Mechanismus konnte in Modellsystemen von

N^2 -Benzoyllycyllysin und H_2O_2 auf die homologe Reihe der Alkanale (C1-C6) unter Ausbildung der entsprechenden stabilen Lysin-Amid-Strukturen übertragen werden.²⁴²

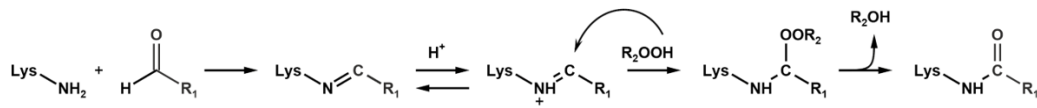


Abbildung 18: Postulierter oxidativer Bildungsmechanismus von Amid-AGEs aus den Reaktionen von Alkanalen mit Lysin.

Auf der anderen Seite wurde auch N^6 -Formyllysin in wässrigen Reaktionen von Lysin mit Formaldehyd nachgewiesen, wobei der postulierte Oxidationsmechanismus unter der Beteiligung eines zweiten Formaldehyd-Moleküls formuliert wurde.²⁴⁸ Spätere Experimente mit isotonenmarkierten Formaldehyd zeigten auch eine biologische Bedeutung von Formaldehyd hinsichtlich der Bildung von N^6 -Formyllysin in Zellkulturen und Rattengewebe an.²⁴⁹⁻²⁵¹ Über die generelle quantitative Bedeutung der Bildung dieser Lysin-Acylierung im Zuge der Lipidperoxidation ist wenig bekannt. Jedoch konnten in der thermischen Inkubation von Sojaöl in Gegenwart von Lysin N^6 -Formyllysin, N^6 -Acetyllysin, N^6 -Propionyllysin und N^6 -Hexanonyllysin semiquantitativ als bedeutendste Modifikationen massenspektrometrisch nachgewiesen werden, während in geringerem Maße N^6 -Butyryllysin, N^6 -Pentanoyllysin und N^6 -Octanoyllysin identifiziert wurden.²⁵² Ein ähnlicher oxidativer Bildungsmechanismus wurde für die Carbonsäure α -Aminoadipinsäure formuliert, welche in Analogie zu den Amid-Strukturen über einen Oxidationsmechanismus der Carbonylgruppe von Aminoadipin mittels H_2O_2 erfolgen soll.²⁵³ Die Nachweise beider Lysin-Derivate in gebratenem Fleisch geben hierbei erste Hinweise für eine Bedeutung des beschriebenen oxidativen Bildungsmechanismus unter typischen Prozessierungs-Bedingungen von Lebensmitteln.²⁵³ Die Bildungen der Amid-AGEs ausgehend von Aldehyden und Hydroperoxiden sind mechanistisch noch nicht abschließend geklärt. Dennoch konnte die bisher lediglich über diesen Reaktionsweg beschriebene Marker-Struktur N^6 -Hexanonyllysin massenspektrometrisch in menschlichem Urin quantifiziert werden und zeigte eine Korrelation mit oxidativen Stressmarkern.^{247,254} Das zeitgleich quantifizierte N^6 -Propionyllysin überstieg N^6 -Hexanoyllysin um das Neunfache. Die höheren Konzentrationen von N^6 -Propionyllysin könnten jedoch auch durch den zusätzlichen Bildungsweg über Propionyl-CoA erklärt werden.^{247,255}

2.4.2 Proteinmodifikationen durch MDA

Produkte, welche sich aus den Reaktionen von MDA mit Lysin und Arginin ergeben, sind in Abbildung 19 dargestellt. Die einfache Kondensation von MDA mit Lysin führt zur Ausbildung von N^6 -Propenal-Lysin (MDA-Lys).²⁵⁶ In Modellreaktionen konnte dieses Addukt auch am N -Terminus der eingesetzten Aminosäuren nachgewiesen werden.²⁵⁶ Aufgrund der zusätzlichen Carbonyl-Funktionalität wird die weitere Reaktion mit einem Lysin-Rest forciert,

welche zur Ausbildung der vinylogenen Amidin-Struktur N^6 -(1-Amino-3-iminopropen)-Lysin (MDA-Lys₂) führt.²⁵⁷

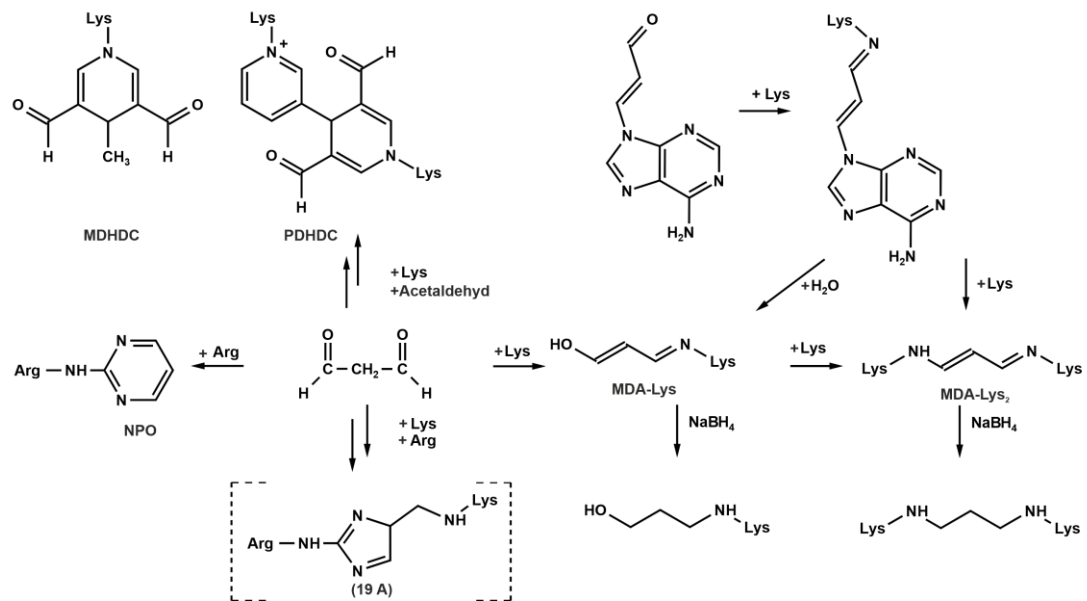


Abbildung 19: Darstellung ausgewählter MDA-Proteinmodifikationen.

Im Gegensatz zu einfachen Schiffischen Basen sind MDA-Lys und MDA-Lys₂ durch Konjugation stabilisiert, welche die allgemeine Möglichkeit des direkten Nachweises beider Moleküle in wässrigen Systemen begründet.²⁵⁸ MDA-Lys₂ wurden zunächst fluoreszierende Eigenschaften und daraus abgeleitet eine Bedeutung in Alterungspigmenten wie Lipofuszin zugeschrieben, jedoch widerlegten nachfolgende Untersuchungen dies.^{258,259} Auf der anderen Seite modifizierte MDA in Modellreaktionen die Amingruppen von Aminosäuren durch Bildung einer 4-Methyl-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbaldehyd (MDHDC)-Grundstruktur, welche fluoreszierende Eigenschaften aufwies ($\lambda_{\text{ex}}=386$ nm, $\lambda_{\text{em}}=454$ nm).²⁶⁰ Die Bildung der Dihydropyridine benötigt Acetaldehyd, welches unter sauren Reaktionsbedingungen auch direkt aus der Fragmentierung von MDA unter Beteiligung von Aminen stammen kann.^{77,261} Die direkte Zugabe von Acetaldehyd lenkte jedoch in Modellsystemen das Produktspektrum stark auf die Seite der Dihydropyridine.²⁶⁰ Prinzipiell können auch weitere Aldehyde als Reaktionspartner dienen, welche das mögliche Produktspektrum weiter auffächern.²⁶⁰ Die freien Carbonylgruppen von MDHDC konnten in Modellinkubationen mit weiteren Nucleophilen unter Ausbildung von Schiffischen Basen kondensieren. Über eine physiologische Bedeutung und Stabilität dieser *crosslink*-Strukturen ist nach aktuellem Stand der Literatur jedoch nichts bekannt.^{262,263} Zusätzlich wurde in einer Modellreaktion von Propylamin und MDA eine weitere potentielle *crosslink*-Imin-Struktur beschrieben, welche einen Pyridin-Grundkörper aufwies.¹²⁹ Allgemein sind Imine in wässrigen Systemen jedoch nicht stabil und werden leicht zu der entsprechenden Carbonyl-Struktur hydrolysiert.²⁶⁴ Eine stabile *crosslink*-Pyridin-Struktur stellt hingegen 4-Pyrimidyl-1,4-dihydropyridine-3,5-dicarbaldehyde (PDHDC) dar, welcher ebenfalls fluoreszierende Eigenschaften

zugeschrieben werden.²⁶⁵ Die Nachweise der MDHDC-Addukte erfolgte massenspektrometrisch in Modellsystemen mittels *Proteomics*. Die Inkubationen von MDA mit Insulin B oder Peptiden aus Sojaprotein und β -Lactoglobulin führten unter physiologischen Bedingungen (pH 7,2-7,4, 37°C) zu den nominalen Massenzunahmen von +54 und +134 an Lysin-Resten, welche auf die Ausbildung von MDA-Lys bzw. MDHDC zurückgeführt werden konnten.²⁶⁶⁻²⁶⁸ Beide Modifikationen wurden am N-Terminus der Proteine sowie an Lysin-Seitenketten gefunden, während die vinyloge Schiffische Base auch an Histidin-, Arginin-, Glutamin- und Asparagin-Resten detektiert wurde.²⁶⁶⁻²⁶⁸ In der Inkubation von Humanalbumin mit annähernd äquimolarer MDA-Konzentration wurde hingegen lediglich die respektive Massenzunahme von MDA-Lysin gefunden.²⁶⁹ Unter sauren Reaktionsbedingungen konnte auch die Indol-Gruppe von Tryptophan durch MDA unter Ausbildung der vinylogen Schiffischen Base modifiziert werden.²⁷⁰ Ein weiterer Bildungsweg von MDA-Proteinmodifikationen konnte in Modellinkubationen von *N*²-Acetyllysin und Adeninpropenal nachgewiesen werden. Hierbei kam es zunächst zu einer Anlagerung von Lysin unter Ausbildung einer Schiffischen Base, welche unter Freisetzung von Adenin entweder mit einem weiteren Lysin-Rest zu MDA-Lys₂ reagierte oder nach hydrolytischer Spaltung MDA-Lys ergab (Abbildung 19).²⁷¹ Der Nachweis des analogen Glycin-Addukts in vorhergehenden Reaktionen von Glycin und Adeninpropenal bestätigte hierbei den Reaktionsmechanismus.²⁵⁷ In Inkubationen von Adeninpropenal mit *N*²-Acetylcystein konnte auch erstmalig S-Oxopropenylcystein nachgewiesen werden.²⁷¹ Entsprechende Modifikationen der Imidazol- oder Guanidin-Gruppe von *N*²-Acetyl-Histidin bzw. *N*²-Acetyl-Arginin konnten unter diesen Reaktionsbedingungen hingegen nicht identifiziert werden.²⁷¹ Dies deckte sich auch mit vorherigen wässrigen Inkubationsversuchen (pH 4,2, Raumtemperatur) von Arginin und Histidin mit MDA, welche zu einer selektiven Modifikation des *N*-Terminus führten.²⁵⁶ Unter stark sauren Reaktionsbedingungen wurde hingegen die Kondensation von MDA mit Arginin beschrieben, welche nach Cyclisierung zu *N*⁵-2-Pyrimidylornithin (NPO) führte.²⁷² Diese Reaktion wurde auch für den direkten Nachweis von MDA unter Verwendung von Arginin oder *N*²-modifizierten Derivaten nach Ionenaustausch oder RP-HPLC beschrieben und diente als eine selektive Alternative für den TBARS-Assay.^{137,273} Auf der anderen Seite wurden auch die stark basischen Guanidinfunktionen von argininhaltigen Peptiden im Rahmen von massenspektrometrischen Untersuchungen gezielt mit MDA modifiziert. Hierbei führte die ausgebildete unpolare 2-Pyrimidyl-Struktur zu verbesserten chromatographischen- sowie Fragmentierungseigenschaften.^{274,275} NPO konnte auch im menschlichen Hautgewebe nach einer sauren Proteinhydrolyse nachgewiesen werden, obwohl dieses unter den gewählten experimentellen Bedingungen vermutlich zum größten Teil bereits im Zuge der Aufarbeitung hydrolysiert wurde.^{272,276} Die in Abbildung 19 dargestellte *crosslink*-Modifikation von Arginin und Lysin

(19 A) wurde hingegen lediglich auf Grundlage eines Artefakts postuliert, welches aus Modellreaktionen nach alkalischer Hydrolyse isoliert wurde. Ein direkter Nachweis dieser Struktur erfolgte jedoch nicht.²⁷⁷ Die Quantifizierung der MDA-Addukte fokussierte sich bisher vor allem auf physiologische Systeme und die Modifikationen von Lysin. Die Analytik entsprechender Proteinmodifikationen in Lebensmitteln hingegen beschränkten sich auf die Untersuchungen von Piche et al., welche MDA-Lys als Hauptstruktur des gebundenen MDAs nach einer enzymatischen Hydrolyse in Fleisch- sowie Fischprodukten nachgewiesen haben.²⁷⁸ Dieses einfache 1:1 Addukt konnte auch im Urin von Menschen und Ratten identifiziert werden.²⁷⁹ Nachfolgende Arbeiten zeigten unter Verwendung von isotopenmarkiertem MDA-Lys, dass dieses in Ratten resorbiert und anschließend ausgeschieden wurde.²⁸⁰ Daneben konnte auch *N*²-Acetyl-*N*⁶-Propenal-Lysin als ein Metabolit in Ratten nachgewiesen werden, wobei die Konzentration mit der Zufuhr von MDA-modifizierten Proteinen korrelierte.²⁸¹ Auf der anderen Seite lieferten die Nachweise von *N*²-Propenalethanolamin und *N*²-Propenalserin in menschlichem als auch in Rattenurin erste Hinweise für die Modifikationen von Phospholipiden durch MDA.^{282,283} Prinzipiell bestätigen diese Nachweise die grundlegende Bedeutung von Propenal-Amin-Addukten sowie deren Stabilität in physiologischen Systemen, wobei in Modellsystemen MDA-Lys auch resistent gegenüber Proteasen war.²⁸⁴ MDA-Lys und MDA-Lys₂ konnten indirekt nach Reduktion und saurer Proteinhydrolyse in nativen sowie oxidierten LDL quantifiziert werden.²⁸⁵ In Thrombozyten von Probanden wurde hingegen MDA-Lys₂ (3,38 ± 1,43 mg/kg Protein) direkt nach einer enzymatischen Hydrolyse quantifiziert.²⁶³ In einer Reihe von verschiedenen Gewebeproben wurde MDA-Lys nach Reduktion und saurer Hydrolyse mittels GC-MS analysiert. Die Gehalte von MDA-Lys waren hierbei im direkten Vergleich zu etablierten AGEs um Faktoren von 2,2-10,7 (CML) bzw. 1,1-3 (CEL) geringer (Tabelle 8).²⁸⁶⁻²⁹³

Tabelle 8: Konzentrationen von proteingebundenen MDA-Lys, CML und CEL in Gewebeproben sowie Plasma.

Gewebeprobe	MDA-Lys	CML	CEL	Literatur
	[μmol/mol Lysin]			
Plasma (Probanden)	19	90	n.b.	²⁸⁶
Plasma (urämische Patienten)	37	313	n.b.	
Rattenniere	228	1595	384	²⁸⁷
Rattenleber	184	536	412	²⁸⁸
Mitochondrien aus Rattenherz	166	1785	185	²⁸⁹
Mitochondrien aus Rattenleber	136	770	410	²⁹⁰
Mäuseherz	558	1459	565	²⁹¹
Schweinemuskel	240	780	680	²⁹²
Mäusegehirn	380	930	460	²⁹³

2.4.3 Proteinmodifikationen durch 4-HNE

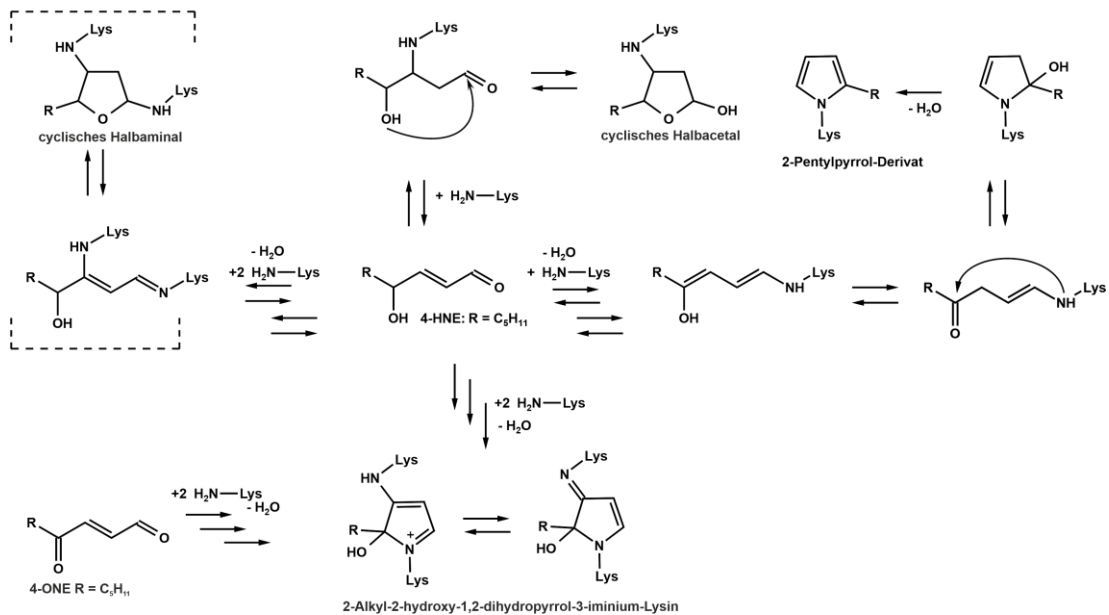


Abbildung 20: Bildung von stabilen Lysin-Modifikationen durch die Reaktionen von Lysin mit 4-HNE und 4-Oxononanal.

4-HNE kann mit den proteingebundenen Aminosäuren Cystein, Histidin und Lysin im Sinne einer Michael-Reaktion reagieren, wobei aufgrund der vorhandenen Hydroxygruppe die initialen Produkte als cyclische Halbacetale stabilisiert werden können (Abbildung 20).^{294–297} Allgemein ist die Bildung der Michael-Addukte von Lysin reversibel und insbesondere die stark sauren Bedingungen einer Proteinhydrolyse forcieren einen Abbau.²⁹⁸ Eine Möglichkeit für den indirekten Nachweis auf Ebene der freien modifizierten Aminosäuren ergibt sich durch die reduktive Stabilisierung unter Ausbildung der entsprechenden Alkohol-Derivate.²⁹⁶ Eine alternative Methode wurde durch die reduktive Aminierung der freien Carbonylgruppe von 4-HNE unter Verwendung eines fluoreszierendenamins beschrieben, welche eine indirekte Möglichkeit zur Analyse von Michael-Addukten verschiedener Proteine nach saurer Hydrolyse mittels HPLC-FLD eröffnete.²⁹⁹ Der massenspektrometrische Nachweis der proteingebundenen Michael-Addukte kann auch indirekt über die nominale Massenzunahme von +154 an den entsprechenden nucleophilen Aminosäuren erfolgen.³⁰⁰ Die zusätzliche Kondensation von Lysin an die Carbonylgruppe von 4-HNE würde zu einem *crosslink*-Addukt führen, welches bisher jedoch nur in Modellsystemen unter Beteiligung von Butylamin in organischen Lösungsmitteln nachgewiesen werden konnte.²⁹⁴ In wässrigen Systemen sind diese Strukturen hingegen nicht stabil.²⁹⁴ Eine stabile und fluoreszierende *crosslink*-Modifikation ($\lambda_{\text{ex}}=362$ nm, $\lambda_{\text{em}}=436$ nm) stellt hingegen 2-Alkyl-2-hydroxy-1,2-dihydropyrrol-3-on iminium dar, welche aus einer Inkubation von Lysin mit 4-HNE isoliert wurde.³⁰¹ Der postulierte Bildungsmechanismus erfordert eine Oxidation, wobei die Bildung der fluoreszierenden Substanz auch direkt aus 4-Oxononanal (4-ONE) sowie 3,4-Dioxononanal erfolgen kann.^{302,303} Die charakteristische Fluoreszenz wurde genutzt um in

Inkubationen von RNase mit 4-HNE einen Modifikationsgrad von ca. 1,8% des Lysin abzuschätzen.³⁰³ Eine strukturell analoge Struktur wurde in Modellsystemen auch für 4-HHE beschrieben.^{302,303} Eine zweite stabile Proteinmodifikation stellt 2-Pentylpyrrol (2-PPL) dar, welche sich nach Dehydratisierung von 4-HNE und Lysin ableitete und in gerösteten Erdnüssen nach enzymatischer Proteinhydrolyse im Bereich von 0,30-0,47 mg/kg Protein quantifiziert werden konnte.³⁰⁴ Diese Proteinmodifikation beschrieb jedoch nur 1% bzw. 2% der Konzentrationsabnahme von 4-HNE während des Röstprozesses mit einer Dauer von 20 min bzw. 40 min.¹⁷⁸ Daneben wurde in einer Inkubation von 4-HNE mit *N*²-Acetyllysin die Ausbildung einer Pyridin-Modifikation auf Grundlage des massenspektrometrischen Zerfallsspektrums postuliert.¹⁷⁸ Eine strukturell analoge Pyridin-Struktur konnte bereits aus Inkubationen von 4-Hydroxypentenal mit Glycin isoliert und strukturell charakterisiert werden.³⁰⁵ Über die Reaktionen von Arginin mit 4-HNE ist hingegen wenig bekannt. Jedoch wurde die Ausbildung von 2-PPL an Arginin-Resten von Cytochrom c, welches zuvor mit 4-HNE inkubiert wurde, auf Grundlage von massenspektrometrischen Experimenten postuliert. Eine finale Strukturaufklärung erfolgte jedoch nicht.³⁰⁶ Andere Autoren zeigten hingegen, dass die Guanidiningruppen verschiedener Peptide inert gegenüber Reaktionen mit 4-HNE waren.^{297,300} Dies wurde auch in Inkubationen von Erdnussproteinen mit verschiedenen molaren Verhältnissen von 4-HNE (pH 7,4, 37°C, 24 h) bestätigt, bei der es zu keiner Konzentrationsabnahme von Arginin kam, während bis zu 25% der Lysin-Reste modifiziert wurden.¹⁷⁸

2.4.4 Proteinmodifikationen durch 4-ONE

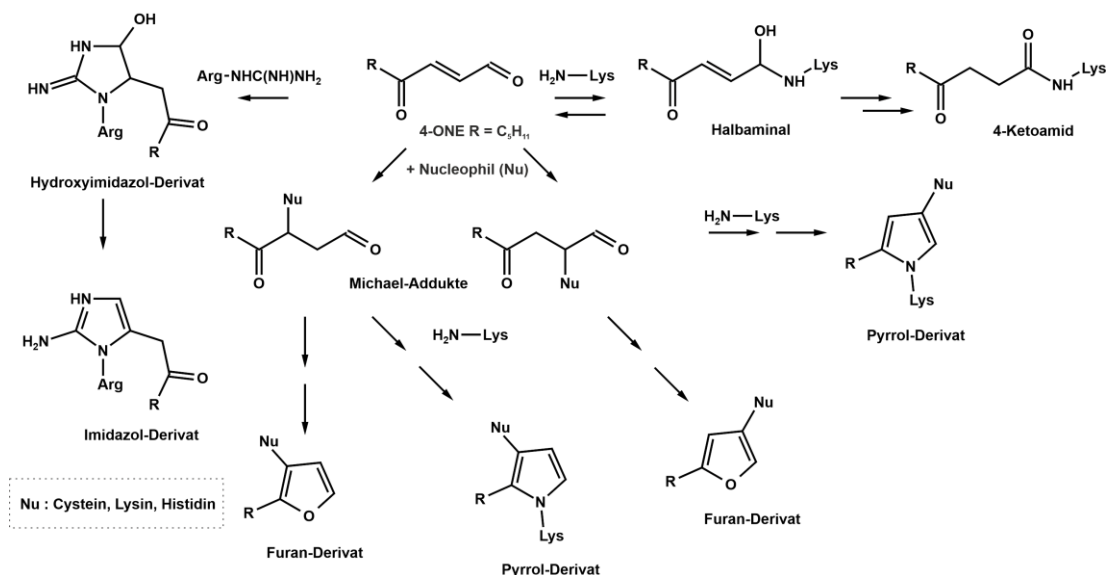


Abbildung 21: Bildung stabiler Aminosäure-Modifikationen durch die Reaktionen von Aminosäuren mit 4-ONE. 4-ONE stellt formal ein Oxidationsprodukt von 4-HNE sowie die deutlich reaktivere Spezies dar. Dies ist auf die bevorzugte Hydratisierung von Aldehydgruppen in wässrigen Systemen zurückzuführen. Während die Hydratisierung bei 4-HNE zu einer Maskierung des

1,2-ungesättigten Carbonyl-Systemen führt, kann dieses bei 4-ONE durch die weitgehend nicht-hydratisierte Keto-Funktion weiterhin ausgebildet werden.³⁰⁰ Die Geschwindigkeitskonstanten k_{4ONE}/k_{4HNE} variierten im Bereich von 110-153 bzw. 6-10 für Reaktionen mit Thiol- bzw. Amin-Verbindungen.²⁹⁷ Die Reaktionen von 4-ONE mit Peptiden, welche Cystein, Lysin und Histidin enthielten, führten zu nominalen Massenzunahmen von +154. Dies wurde zunächst durch die Ausbildung der Michael-Addukte erklärt, welche an Position C2 oder C3 erfolgen kann.^{297,307} Die weitere Addition eines Lysin-Restes an die freie Aldehydgruppe führte nach einer Paar-Knorr-Kondensation zur Ausbildung von 2,3- und 2,4-substituierten Pyrrolen, welche in Modellinkubationen nachgewiesen wurden.³⁰⁷⁻³¹⁰ Auf der anderen Seite gingen hierbei auch Furan-Derivate hervor, welche sich durch die Cyclisierung der Michael-Addukte ergaben.^{307,311} Nachfolgende Arbeiten von Zhu und Sayre identifizierten zusätzlich ein stabiles 4-Oxo-(N-5-amino-5-carboxypentyl)-nonansäureamid (4-Ketoamid), welches durch die Isomerisierung der initial gebildeten Schiffsbasis erklärt wurde.^{310,312} In Inkubationen von 6-Amino-2-[(2-benzamidoacetyl)amino]-hexansäure (Hippuryl-Lysin) und 4-ONE wurde diese 4-Ketoamid-Modifikation nach zwei Tagen Inkubationszeit mit einer Ausbeute von ca. 1% gebildet, während die Schiffsbasis und das entsprechende Michael-Addukt instabil waren.³¹² In Plasma HDL wurde 4-Ketoamid ($15,3 \pm 5,6$ pmol/mg Protein) mittels LC-MS/MS quantifiziert und war bei Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie erhöht.³¹³ Daneben konnte die 4-Ketoamid-Modifikation indirekt nach Reduktion mittels NaBH_4 in enzymatisch hydrolysierten Gewebeproteinen von Mäusen mit einer Apolipoprotein E Defizienz nachgewiesen werden.³¹⁴ In Zellkultur wurden Lysin-Reste von Histon-Proteinen durch 4-Ketoamid modifiziert, wobei SIRT 2 eine Deacylase-Aktivität gegenüber dieser Modifikation *in vitro* zeigte.^{315,316}

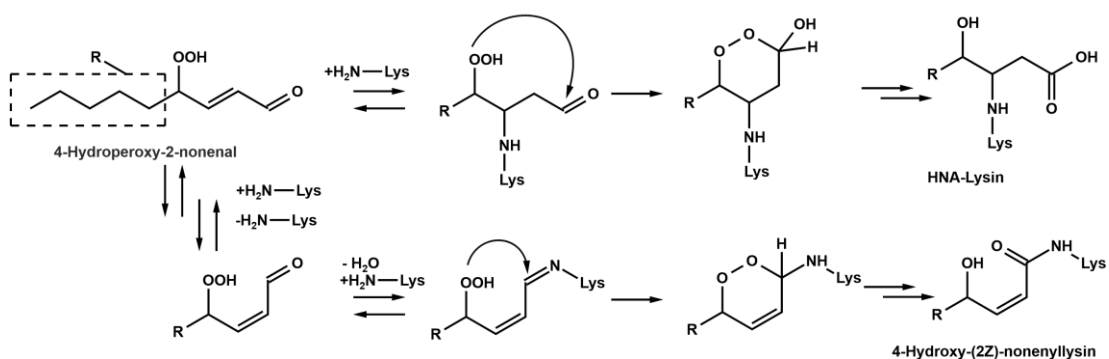


Abbildung 22: Bildung stabiler Lysin-Modifikationen durch die Reaktion von Lysin mit 4-HPNE.

4-Hydroxy-2(Z)-nonenyllysine stellt eine strukturell ähnliche 4-Ketoamid-Struktur dar, welche direkt aus der Reaktion von 4-HPNE mit Lysin hervor ging (Abbildung 22). Die Bildung soll ausgehend von der Schiffsbasis über eine Bayer-Villiger-Oxidation erfolgen.³¹⁷ Analog hierzu verläuft der postulierte Bildungsmechanismus von *N*⁶-4-hydroxynonanoic acid-lysine (HNA-Lysin) über das initiale Michael-Addukt.³¹⁷

Die physiologische Bedeutung von Arginin-Modifikationen von 4-ONE sind hingegen unklar und die Identifikation von einzelnen Strukturelementen beschränkte sich bisher vollständig auf Modellreaktionen. So führte die Inkubation von N^2 -Boc-Arginin mit 4-ONE zu einer cyclischen Halbamin-Struktur, welche nach Erhitzen (80°C, 4 h) nahezu quantitativ in eine stabile Imidazol-Struktur dehydratisierte und im Ergebnis den Kondensationsprodukten von Arginin und 1,2-Dicarbonylen ähnelte (Abbildung 21).³¹⁸ Die Dehydratisierung erfolgte in nachfolgenden Arbeiten auch bei 37°C über einen längeren Zeitraum.³¹⁹ Die entsprechende Imidazol-Struktur wurde auch indirekt an der Guanidin-Gruppe von Arginin in Inkubationen von 4-ONE mit Peptiden bzw. Angiotensin massenspektrometrisch nachgewiesen.^{318,319}

2.4.5 Proteinmodifikationen durch 4,5-Epoxy-2-alkenale

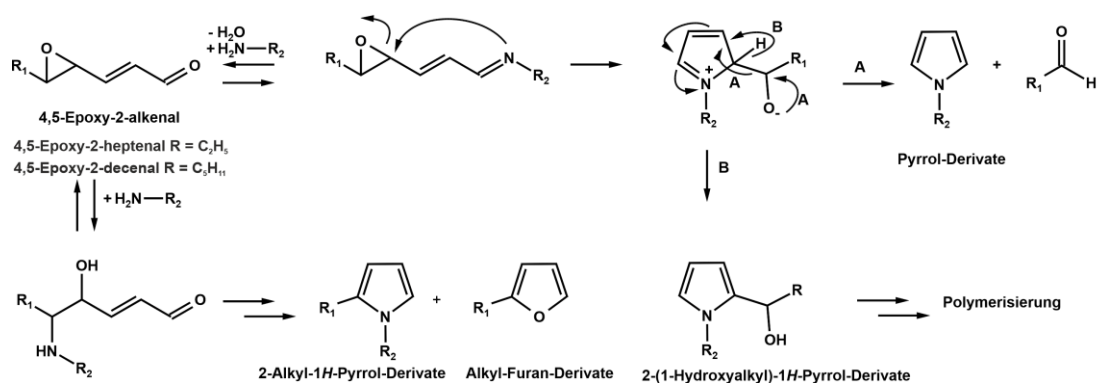


Abbildung 23: Bildung stabiler Lysin-Modifikationen durch die Reaktion von Lysin mit EP-decenal und EP-heptenal.

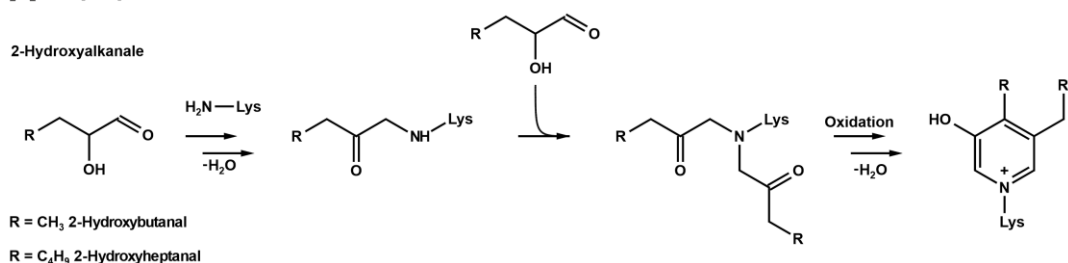
Im Grunde gehen aus den Reaktionen von 4,5-Epoxy-2-alkenalen mit Aminen drei verschiedene monomere Pyrrol-Derivate hervor.³²⁰ In Modellreaktionen von EP-heptenal mit Butylamin und Glycinmethylester stellten die initial gebildeten 1-Alkyl-2-(1-Hydroxyalkyl)-Pyrrol-Strukturen keine stabilen Produkte dar und neigten zu weiterer Polymerisierung unter Ausbildung von Farbe sowie Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}}=350$ nm, $\lambda_{\text{em}}=440$ nm).³²¹ Nachfolgende Inkubationen von Lysin mit EP-heptenal führten zu ϵ -Pyrrolylnorleucin, dessen postulierter Bildungsmechanismus mit der Freisetzung von Propanal begleitet war (Abbildung 23).³²² Dieses Pyrrol-Derivat wurde auch in einer Reihe von Lebensmitteln nach alkalischer Hydrolyse im Konzentrationsbereich von 0,24-6,36 $\mu\text{mol/g}$ Lebensmittel mittels Kapillarelektrophorese quantifiziert.³²³ Daneben kann die Bildung von ϵ -Pyrrolylnorleucin jedoch auch auf die Reaktionen von Lysin mit GO und GA zurückgeführt werden.³²⁴ In Modellsystemen von Phenylalanin mit EP-heptenal und EP-decenal wurden auch die entsprechenden *N*-substituierten 2-Ethyl- bzw. 2-Pentylpyrrol-Derivate nachgewiesen, während zeitgleich 2-Alkyfurane gebildet wurden.³²⁵

2.4.6 Proteinmodifikationen durch 2-Hydroxyalkanale

2-Hydroxyalkanale können als die kleinste Einheit von reduzierenden Zuckern aufgefasst werden. Dies ermöglicht neben den Kondensationen mit Aminen unter Ausbildung von

Schiffschen Basen auch die nachfolgenden Umlagerungen zu entsprechenden 1-Amino-2-keto-Verbindungen, welche strukturell den Amadori-Produkten gleichen.^{326–328} In Inkubationen von *N*²-Hippuryl-Lysin und 2-Hydroxyheptanal konnte eine Pyridin-Struktur charakterisiert werden, welche die nahezu zeitgleich publizierten Ergebnisse von Liu und Sayre bestätigten.³²⁸ Letztere konnten in Modellreaktionen von 2-Hydroxybutanal und 2-Hydroxyheptanal mit verschiedenen primären Aminen als auch *N*²-Benzyloxycarbonyl-Lysin (*N*²-Cbz-Lysin) die stabilen und fluoreszierenden ($\lambda_{\text{ex}}=327$ nm, $\lambda_{\text{em}}=390$ nm) 4,5-dialkylierten-3-Oxo-Pyridin-Strukturen isolieren (Abbildung 24). Der postulierte Reaktionsmechanismus beinhaltet zunächst die Ausbildung eines Di-Amadori-Produkts, welches nach Cyclisierung und Oxidation zur stabilen Pyridin-Struktur führen sollte.³²⁶ Die Inkubationen von 2-Hydroxyheptanal mit 4-Alkylimidazol und *N*-Alkylguanidin-Derivaten, welche Modellsubstanzen für Reaktionen der Protein-Seitenketten von Histidin und Arginin darstellten, ergaben hingegen keine Bildungen von stabilen oder fluoreszierenden Substanzen.³²⁶ In Modellreaktionen von 2-Hydroxyheptanal mit RNase konnte anhand der UV-Absorption abgeschätzt werden, dass etwa 3,8% der Lysin-Reste durch die entsprechende Pyridin-Struktur modifiziert waren. Der hohe Modifikationsgrad von Lysin (~75%) im Allgemeinen muss dabei überwiegend durch die Ausbildung von anderen Strukturelementen wie beispielsweise der einfachen Amadori-Produkte erklärt werden.³⁰⁷

A Lipidperoxidation



B Maillard-Reaktion

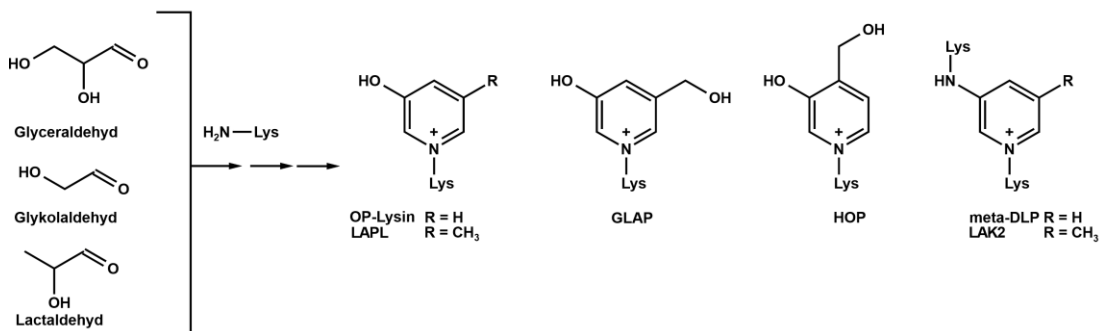


Abbildung 24: Bildung stabiler Lysin-Pyridin-Strukturen im Zuge der Lipidperoxidation (A) sowie Maillard-Reaktion (B). Abkürzungen: 2-Ammonio-6-(3-oxidopyridinium-1-yl)hexanoat (OP-Lysin); lactaldehyde-derived pyridinium-type lysine adduct (LAPL), glyceraldehyde-derived pyridinium (GLAP) – 2-Ammonio-6-[4-(hydroxymethyl)-3-oxidopyridinium-1-yl]-hexanoat (HOP), 1-(5-Amino-5-carboxypentyl)-3-(5-amino-5-carboxy-pentylamino)pyridinium salt (meta-DLP), lactaldehyd-derived lysine dimer (LAK2).

Prinzipiell steht die Ausbildung der Pyridin-Proteinmodifikationen ganz im Einklang mit dem Reaktionsverhalten von Lactaldehyd und GA, welche ebenfalls als α -Hydroxy-Carbonylverbindungen unter Beteiligung von Lysin sowie weiteren (Hydroxy-) Carbonylen zu einer Reihe von strukturell analogen Pyridin-Strukturen cyclisieren (Abbildung 24).^{14,329-332} Darüber hinaus konnte in einer Modellinkubation von 6-Aminocapronsäure und 2-Hydroxyheptanal auch ein 4-Pentylimidazol-Derivat isoliert werden, dessen Strukturelement unter Beteiligung von Lysin auch für die Quervernetzung von RNase nach Inkubation mit 2-Hydroxyheptanal verantwortlich sein könnte.³²⁶

2.4.7 Proteinmodifikationen durch Alkanale, 2-Alkenale und 2,4-Alkendienale

Einfache Alkane können mit Lysin zunächst reversibel unter Ausbildung von Schiffchen Basen reagieren. Stabile Produkte gehen hingegen erst nach weiteren Reaktionen wie beispielsweise durch die bereits beschriebene Oxidation zu Amid-Strukturen hervor (Kapitel 2.4.1). Allgemein eröffnet eine Reduktion mittels Natriumcyanoborhydrid (NaBH_3CN) jedoch eine analytische Möglichkeit für den indirekten Nachweis der entsprechenden Schiffchen Base über das stabile Amin. Beispielsweise ging N^6 -Hexyllysin in Modellsystemen aus Hexanal und Lysin nach Reduktion hervor.³³³ Auf der anderen Seite konnten in Modellsystemen, bei denen Propanal, Butanal und Hexanal mit Aminosäuren sowie primären Aminen reagierten, verschiedene substituierte Pyridin-Strukturen isoliert und charakterisiert werden.^{334,335} Nachfolgende Arbeiten identifizierten dann auch eine entsprechende 1,2,3,5-substituierte Lysin-Pyridin-Modifikation in verschiedenen Modellsystemen unter Beteiligung von Hexanal, wobei der postulierte Bildungsmechanismus drei Moleküle Hexanal beinhaltet und über mehrere Aldol-Kondensationen sowie Oxidationsreaktionen verlaufen soll (Abbildung 25).³³⁶ Die Reaktionen von Alkenalen mit Nucleophilen sind überwiegend durch die initialen Reaktionen unter Ausbildung der Michael-Addukte sowie der Schiffchen Basen verstanden, welche bereits in Kapitel 2.4.3 diskutiert wurden.³³⁷ Insbesondere freie Cystein-Reste von Modellpeptiden reagierten mit Acrolein unter Ausbildung labiler Michael-Addukte, wobei dies auch die Reaktivität für die nachfolgende Ausbildung einer Schiffchen Base erhöhte.³³⁷ Der Nachweis von Michael-Addukten von 2-Alkenalen erfolgte in enzymatisch hydrolysierten Proteinen von Gewebeproben. Hierbei wurden die freien Carbonylgruppen der Seitenkettenmodifikationen der Proteine mittels Biotin-Tags modifiziert, welcher die nachfolgende Affinitätsreinigung in Kombination mit der massenspektrometrischen Analyse ermöglichte. In Mitochondrien, welche aus Herzen von Ratten isoliert wurden, konnten 85% der Modifikationen auf Cystein, 12% auf Histidin und nur 3% auf Lysin zurückgeführt werden.³³⁸ Innerhalb dieser modifizierten Protein-Seitenketten wurde der überwiegende Teil durch Acrolein (84%) hervorgehoben, während zu geringeren Teilen Peptide durch Crotonaldehyd, 4-HHE, 4-HNE oder 4-ONE modifiziert wurden.³³⁸ Auf der anderen Seite könnten Aldehyde, welche cyclische Halbacetale der

entsprechenden Michael-Addukte ausbilden, im Zuge der Aufarbeitung deutlich diskriminiert worden sein.³³⁹ Die Gehalte an Michael-Addukten von Cystein und Acrolein korrelierten im Tiermodell auch mit oxidativem Stress und waren gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.³³⁹ Auf der anderen Seite war N^7 -(3-Propanal)-Histidin in oxidierten LDL für etwa 10% der Abnahme von Histidin verantwortlich.³⁴⁰ Daneben waren auch die Bildungen von Pyridin-Proteinmodifikationen aus den Reaktionen von 1,2-ungesättigten Carbonylverbindungen mit Lysin verstanden. So wurden entsprechende Pyridin-Derivate von Acrolein, Crotonaldehyd, 2-Hexenal, 2-Heptenal, 2-Octenal, 2-Nonenal und 2,4-Decadienal bereits in verschiedenen Modellsystemen beschrieben (Abbildung 25).³⁴¹⁻³⁴⁶ Beispielsweise wird N^6 -(3-Methylpyridinium)-Lysin (MP-Lysin) aus der Reaktion von Lysin mit zwei Molekülen Acrolein gebildet.³⁴¹ Analog zu diesem Mechanismus cyclisiert das Lysin-Crotonaldehyd-Addukt zu dem strukturellen Pendant N^6 -(5-Ethyl-2-methylpyridinium)-Lysin (EMP-Lysin).³⁴² Weitere Beispiele für Alkyl-Pyridin-Proteinmodifikationen stellen N^6 -[(3-Hept-1-enyl)-4-hexylpyridinium]-Lysin (HHP-Lysin) und N^6 -[(3-Pent-1-enyl)-4-butylpyridinium]-Lysin (BBP) dar, welche aus den Reaktionen von Lysin mit 2-Nonenal bzw. 2-Heptenal hervorgehen.^{343,344}

Darüber hinaus konnten einige Strukturen in Lebensmitteln oder in physiologischen Systemen nachgewiesen werden. MP-Lysin wurde in Erdnüssen quantifiziert und die Bildung korrelierte mit der Röstzeit.³⁴⁷ In Modellsystemen beschrieb MP-Lysin bei geringer Acrolein-Konzentration nahezu quantitativ die Lysin-Modifikationen von Erdnussproteinen, während die Bedeutung bei höheren Konzentrationen von Acrolein deutlich zurücktrat.³⁴⁷ Eine zu MP-Lysin strukturell analoge Verbindung, welche aus Carnosin und Acrolein hervorging, konnte in menschlichem Urin quantifiziert werden und könnte eine Bedeutung hinsichtlich der Detoxifikation von freiem Acrolein *in vivo* haben.³⁴⁸ Hingegen konnte MP-Lysin auch direkt in oxidierten LDL identifiziert werden.³⁴⁰ Daneben konnten die *cis*- und *trans*-Isomere der Pyridin-Strukturen aus 2-Nonenal in Gewebeproben von Mäusen nachgewiesen werden, welche zuvor durch einen intraperitoneal injizierten Komplex aus Eisenionen (Fe^{3+}) und Nitritotriessigsäure oxidativen Stress ausgesetzt wurden.³⁴³ Ein direktes Folgeprodukt des Michael-Addukts von Lysin und Acrolein stellt die heterocyclische Verbindung N^6 -(3-Formyl-3,4-dehydropiperidino)-Lysin (FDP-Lysin) dar, welche sich nach einer weiteren Michael-Addition sowie Aldol-Reaktion und Dehydratisierung ergibt (Abbildung 25). Dieses konnte bereits in oxidierten LDL nachgewiesen werden.⁹⁰ Eine entsprechende analoge Struktur von Crotonaldehyd stellt Dimethyl-FDP-Lysin dar.^{342,349} Aus der Reaktion von Acrolein und N^2 -*t*-Boc-Arginin ging ein cyclisches Produkt hervor, welches in Modellsystemen nachgewiesen wurde.³⁵⁰ In Inkubationen von Erdnussproteinen mit Acrolein wurden jedoch die Seitenketten von Lysin und Histidin deutlich stärker modifiziert, als die entsprechenden Guanidingruppen von Arginin.³⁴⁷ Dies deckte sich auch mit

Modellreaktionen von Humanalbumin mit Acrolein, wobei bevorzugt Lysin- und Histidin-Seitenketten strukturell verändert wurden, während Arginin inert war.³⁵¹ Auch für mehrfach ungesättigte Alkenale sind Reaktionen mit Aminosäuren bekannt. Beispielsweise reagierte 2,4-Decadienal in Inkubationen mit Lysin unter Ausbildung der Schiffsbasen, während Cystein und Histidin entsprechende Michael-Addukte bzw. Enamine ausbildeten.^{352,353} In Inkubationen von RNase und β -Lactoglobulin führte 2,4-Decadienal zu einem ähnlichen Ausmaß an Proteinquervernetzungen, wie durch 4-HNE oder 4-ONE. Über den Strukturtyp ist jedoch nichts bekannt.³⁰⁷

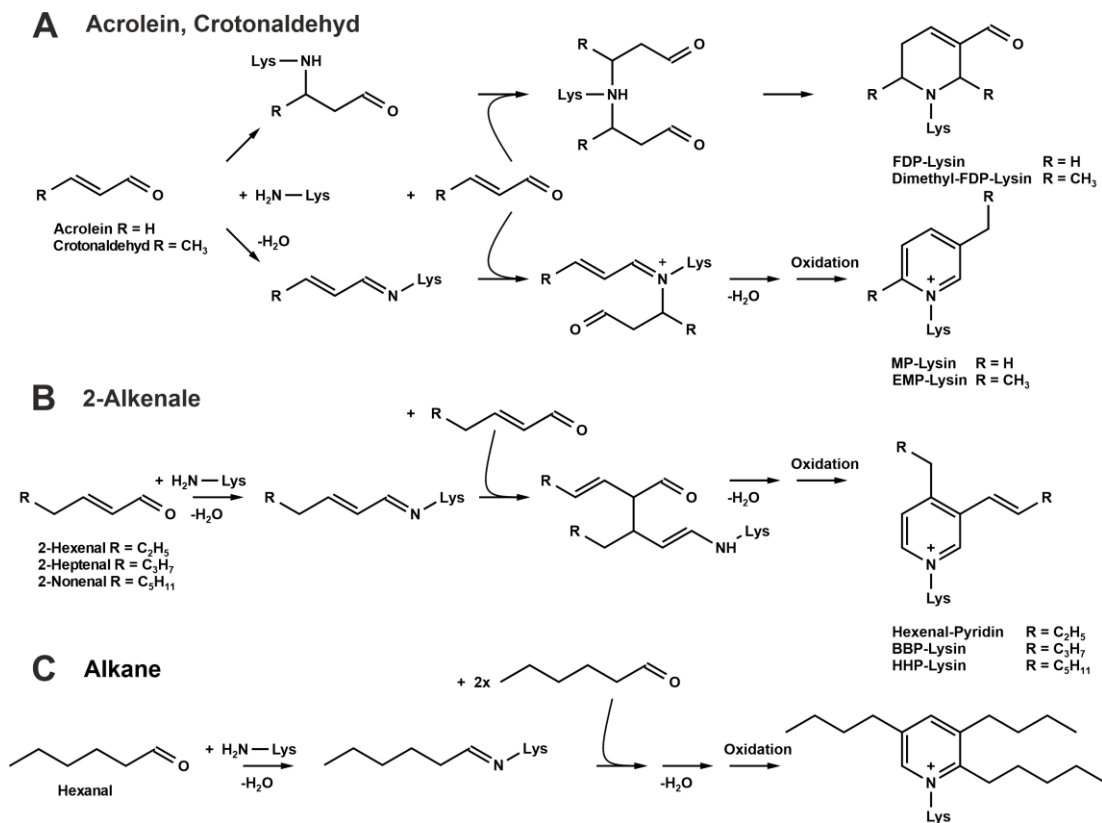


Abbildung 25: Bildung von heterocyclischen Lysin-Modifikationen aus den Reaktionen von Lysin mit Acrolein und Crotonaldehyd (A), 2-Hexenal, 2-Heptenal und 2-Nonenal (B) sowie Hexanal (C).

2.5 Proteinquervernetzungen in Lebensmitteln

2.5.1 Bildung von Isopeptidbindungen durch Transaminierung

Neben der Maillard-Reaktion und der Lipidperoxidation führen weitere Bildungswege zu Quervernetzungen von Proteinen in Lebensmitteln. So katalysiert die Transglutaminase die Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen proteingebundenem Glutamin und Lysin (Abbildung 26). Hierbei wird die Amid-Bindung von Glutamin unter Bildung eines proteingebundenen Thioesters aktiviert, welcher folgend entsprechend des bereits diskutierten Acylierungsmechanismus mit Lysin kondensiert.³⁵⁴ Der gezielte Einsatz der Transglutaminase wird z.B. bei der Herstellung von Fleisch-, Soja- oder Getreideerzeugnissen lebensmitteltechnologisch genutzt.^{17,355} Nur unter drastischer Temperaturführung (130°C, 1 h)

kann eine Isopeptidbindung auch durch eine direkte nicht-enzymatische Reaktion von Lysin mit Glutamin bzw. Asparagin ausgebildet werden.^{356,357} N^6 -Glutamyllysin konnte in Lebensmitteln nach enzymatischer Proteinhydrolyse im Konzentrationsbereich von 0,5-371 mg/kg Protein quantifiziert werden. Hierbei zeigten verschiedene Fleisch- (37-197 mg/kg Protein) und Fischprodukte (30-143 mg/kg Protein) im Mittelwert die höchsten Konzentrationen, während Milchprodukte kein N^6 -Glutamyllysin enthielten.³⁵⁸ Es gibt Hinweise darauf, dass höhere Organismen N^6 -Glutamyllysin enzymatisch metabolisieren können. So katalysiert beispielsweise die γ -Glutamylamin-Cyclotransferase die Freisetzung von Lysin und in Fütterungsexperimenten konnten Ratten modifiziertes Casein, welches zuvor mit einer Transglutaminase behandelt wurde, als Lysin-Quelle nutzen.^{359,360}

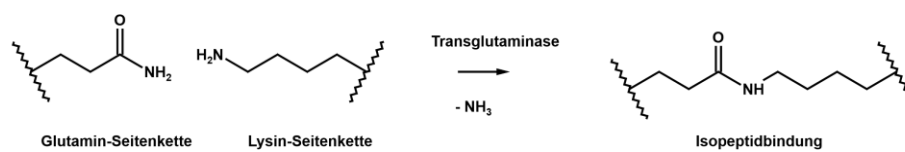


Abbildung 26: Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen Glutamin und Lysin katalysiert durch die Transglutaminase.

2.5.2 Proteinmodifikationen ausgehend von Dehydroalanin

Unter alkalischen Bedingungen werden Dehydroalanin-Strukturen ausgehend von der β -Eliminierung von Cystein, Serin oder den entsprechenden substituierten Derivaten gebildet (Abbildung 27). Für die Eliminierung wurde sowohl ein einstufiger als auch ein zweistufiger Mechanismus vorgeschlagen. Bei Letzterem kommt es zunächst zu einer Abstraktion des α -Protons unter Ausbildung eines Carbanions, welches prinzipiell reversibel und unter Racemisierung rückreagieren kann.³⁶¹ In einem zweiten Schritt wird dann die Dehydroalanin-Struktur durch eine Eliminierung der entsprechenden Abgangsgruppen gebildet. Im Sinne eines einstufigen Mechanismus verläuft hingegen die Abstraktion des Protons und die Eliminierung der entsprechenden Abgangsgruppe in einem Schritt.³⁶¹ Prinzipiell geht die Bildungseffizienz von Dehydroalanin-Strukturen mit der Qualität der Abgangsgruppe einher, sodass insbesondere die in Casein vorkommenden Phospho- und Glyko-modifizierten Serin-Reste deutlich bessere Abgangsgruppen als die Hydroxygruppe des nativen Serins darstellen.³⁶² Die gezielte Hydrolyse von Phosphoserin durch den Einsatz von Phosphatasen kann der Bildung von Dehydroalanin sowie der nachfolgenden Reaktionsprodukte deutlich entgegenwirken.^{363,364} Grundsätzlich steht Dehydroalanin den weiteren Reaktionen mit Nucleophilen wie Histidin-, Cystein-, Ornithin- oder Lysin-Resten zur Verfügung. Dies führt zur Ausbildung der stabilen *crosslink*-Proteinmodifikationen Histidinoalanin, Lanthionin, Ornithinoalanin und Lysinoalanin (LAL) (Abbildung 27).³⁶¹ Strukturell analoge Verbindungen ergeben sich nach Addition der entsprechenden Aminosäuren an die Methyl-Dehydroalanin-Struktur, welche nach einer Eliminierungsreaktion aus Threonin hervorgeht.³⁶¹ Die Proteinquervernetzung durch LAL und Histidinoalanin wurde vor allem in

Milchprodukten beschrieben (Tabelle 9), wobei letzteres ein Verhältnis der *N*- τ - und *N*- π -Isomere von etwa 8:1 zeigte. *N*- τ -Histidinoalanin wurde im Bereich von 50-1800 mg/kg Protein in einer Reihe von Milchprodukten quantifiziert und lag somit in einer Größenordnung mit LAL.³⁶⁵ Die Identifizierung der entsprechenden Lysinomethylalanin- und Histidinomethylalanin-Derivate begrenzte sich jedoch auf Modellreaktionen, während diese in Milchprodukten nicht nachweisbar waren.³⁶⁶ In ultrahocherhitzter Milch (UHT-Milch) lag der Median von LAL (~28 mg/kg Protein) in der Größenordnung von CML (~34 mg/kg Protein).³⁶⁷

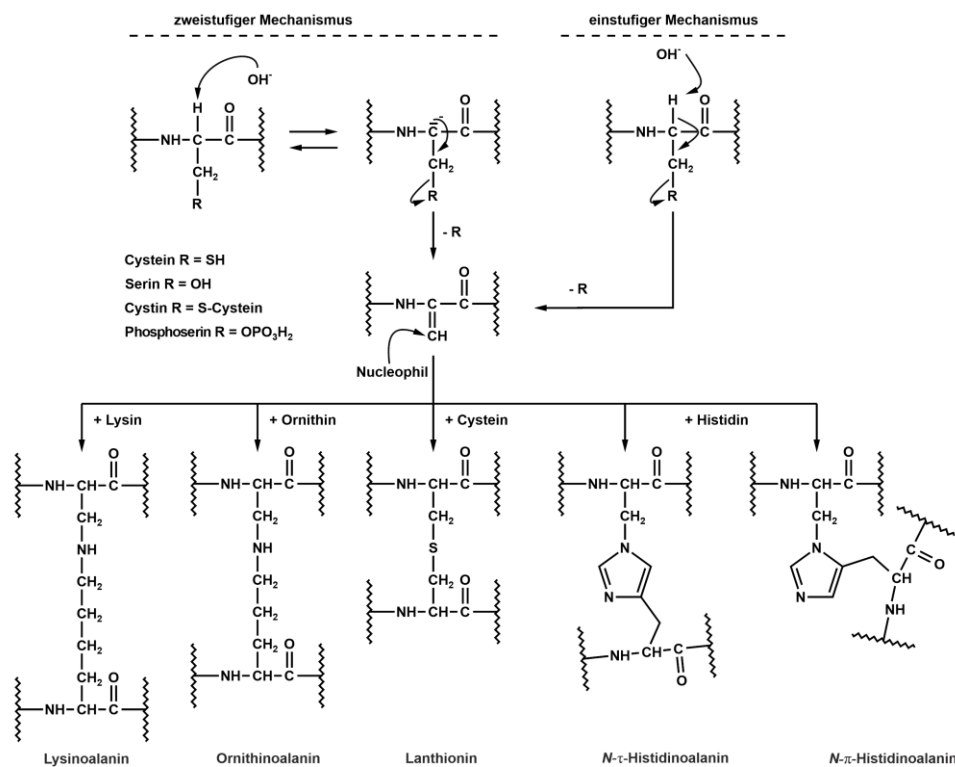


Abbildung 27: Bildung stabiler Proteinmodifikationen durch die Reaktionen von Dehydroalanin mit Aminosäuren.

Tabelle 9: Konzentrationen von Histidinoalanin, LAL und Lanthionin in Lebensmitteln.

Matrix	Behandlung	Histidinoalanin	LAL	Lanthionin	Literatur
Magermilch	100°C, 30-120 min	450-2022	630-1430	n.b.	
Kondensmilch		950-1800	410-660	n.b.	365
Natriumcaseinat		50-550	50-2200	n.b.	
Säuglingsnahrung		n.w.	n.w.-180	n.b.	
Casein-Lösung	140°C, 60 s	91	165	n.b.	368
	140°C, 150 s	149	310		
Milch	sterilisiert	n.b.	224-653	n.b.	369
	pasteurisiert	n.b.	17-47	n.b.	
Milch	UHT	n.b.	22-37	n.b.	367
Säuglingsnahrung		n.b.	39-166	n.b.	
Gebäckene Brezeln	250°C, 3 min und 135°C, 10 min	n.b.	2097	10400	370
Milch	UHT	n.b.	253	21	371

3 Zielstellung

Die Maillard-Reaktion führt zu Modifikationen der proteinogenen Aminosäuren Lysin und Arginin, welche insbesondere bei der Zubereitung von Lebensmitteln forciert werden. Die so gebildeten AGEs stellen eine strukturell heterogene Gruppe an irreversiblen Proteinmodifikationen dar, deren Gehalte stark von den Prozessierungs-Bedingungen abhängig sind. Die Frage der ernährungsphysiologischen Wertigkeit von entsprechend modifizierten Proteinen geht auch mit einer Struktur-Wirkungsbeziehung einher, die auf einer validen Strukturaufklärung sowie Analytik einzelner AGEs basieren muss. Trotz der umfangreichen Untersuchungen von Lebensmitteln innerhalb der letzten drei Jahrzehnte wird das Ausmaß von Proteinmodifikationen in Lebensmitteln auf Grundlage von nur wenigen ausgewählten AGEs beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der analytische Transfer von GO- und MGO-AGEs, welche aus Modellinkubationen von GO und MGO mit Lysin oder Arginin bekannt waren, auf zwei Lebensmittelmatrices. Hierbei lag der Fokus auf den Untersuchungen von Fleisch sowie Backwaren, welche eine wichtige Rolle in der westeuropäischen Diät einnehmen. Neben der reinen Identifizierung sollten deren Bildungen mit intrinsischen als auch exogenen Einflussfaktoren in Verbindung gebracht werden. Im Hinblick auf die analytischen Herausforderungen, die sich aus den komplexen Matrices und den geringen Konzentrationen ergeben, stellt die Hochleistungs-Flüssigchromatographie mit gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (HPLC-MS/MS) die Methode der Wahl dar. Insbesondere über die Bedeutung von *crosslink*-AGEs war bisher in Lebensmitteln wenig bekannt, obwohl diese durch intra- und intermolekulare Proteinquervernetzung in einem besonderen Maße zu veränderten physikochemischen Eigenschaften der Proteine führen können. In diesem Kontext ist auch die Identifikation von völlig neuen Strukturelementen wichtig. Eine Arbeitshypothese lag bei der Ausbildung von Amidin-AGEs während der Zubereitung von Lebensmitteln, welche aus den Reaktionen von Lysin mit GO und MGO hervorgehen sollen. Für den Beleg dieser These ist zunächst die Entwicklung einer organischen Synthesestrategie sowie die umfassende spektroskopische Charakterisierung der authentischen Referenzstrukturen nötig. Nachfolgend muss eine Kompatibilität mit den bereits etablierten Verfahren zur Proteinisolierung sowie Proteinhydrolyse evaluiert werden und schließlich alle Analyten in eine chromatographische Methode eingebunden werden. In einem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten dann Proteinmodifikationen in Lebensmitteln nachgewiesen werden, die spezifische Markerstrukturen für das Lipidperoxidationsprodukt MDA darstellen und deren quantitative Bedeutungen in Lebensmitteln bisher völlig unbekannt sind. Die Etablierung analytischer Methoden zur Quantifizierung dieser Markersubstanzen eröffnet eine Möglichkeit für den direkten Vergleich zwischen Maillard-Reaktion und Lipidperoxidation

hinsichtlich der Bildung von Proteinmodifikationen während der Zubereitung von Lebensmitteln. Neben der reinen Analytik einzelner AGEs sollte die vorliegende Dissertation auch zu einem besseren mechanistischen Verständnis der entsprechenden Bildungswege in Lebensmitteln beitragen. Allgemein wird dies durch die parallelen Bildungsmöglichkeiten von AGEs erschwert, welche auch unabhängig von 1,2-Dicarbonylverbindungen verlaufen. Der gezielte Einsatz von Modellinkubationen eröffnet jedoch eine Möglichkeit die Bedeutung einzelner Reaktionswege abzuschätzen. Die prozessbegleitende Analytik von verschiedenen AGE-Präkursoren während der Zubereitung von Lebensmitteln ist somit für das Verständnis der mechanistischen Hintergründe der AGE-Bildung essentiell. Während grundsätzlich in der Literatur bereits analytische Methoden zusammen mit entsprechenden Strategien der Derivatisierung für verschiedene Carbonylverbindungen beschrieben sind, müssen die exakten Reaktionsbedingungen zusammen mit matrixangepassten Aufarbeitungsmethoden hinsichtlich eines hohen Probendurchsatzes entwickelt werden. Daneben sollten in den verschiedenen Matrices jeweils der mechanistische Ursprung von 1,2-Dicarbonylen abgeschätzt werden, welcher durch verschiedene Reaktionswege wie beispielsweise dem Abbau von Kohlenhydraten oder Lipiden erklärt werden könnte.

4 Diskussion und Einordnung der Ergebnisse

4.1 Bildung von AGEs durch das Erhitzen von Schweinefleisch

4.1.1 Vergleichende Analyse von GO- und MGO-AGEs in gebratenem Schweinefleisch

Fleisch ist ein fett- sowie proteinreiches Lebensmittel (Tabelle 10), welches während der entsprechenden Zubereitung wie beispielsweise Braten, Backen oder Grillen Temperaturen von 150°C-200°C ausgesetzt wird. Dies forciert grundsätzlich zum einen die Oxidation von Lipiden und zum anderen den Abbau von Kohlenhydraten, wobei beide Reaktionswege im Ergebnis zu der Ausbildung von stabilen Proteinmodifikationen (AGEs bzw. ALEs) führen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Bratzeit auf die Bildung von stabilen GO- und MGO-AGEs sowie Intermediaten der Maillard-Reaktion umfassend analysiert. Hierbei wurde Schweinehackfleisch gewählt, welches in einem Bratversuch in Form von definierten Patties mit einer Dicke von jeweils 1 cm mit einem Kontaktgrill bei 200°C für je 3,5 und 8 min gebraten wurde. Die Kerntemperatur erreichte nach 5 min 95°C und blieb folgend konstant (Abbildung 28). Aufgrund des steigenden Bratverlusts mit fortlaufender Bratzeit wurden die Proben für eine Standardisierung der späteren Analysen lyophilisiert und entfettet.

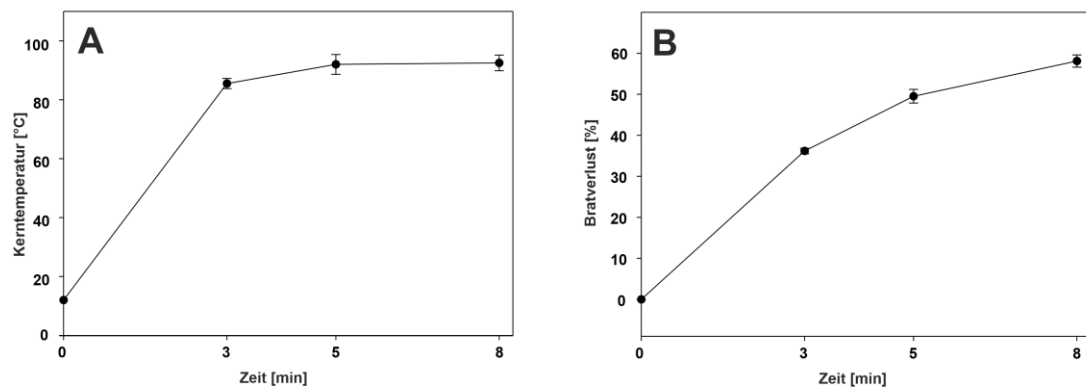


Abbildung 28: Veränderung der Kerntemperatur (A) sowie des Bratverlusts (B) beim Grillen (200°C) von Schweinehackfleisch.

Tabelle 10: Nährstoffzusammensetzung von rohem Schweinehackfleisch.

Wasser	Fett	Protein	Asche	Hydroxyprolin	pH-Wert
[g/100g Fleisch]					(-)
66,2 ± 0,7	15 ± 2	18 ± 2	0,90 ± 0,02	0,17 ± 0,02	6,0

Die vorliegende Arbeit setzte ihren Fokus auf die massenspektrometrische Quantifizierung von AGEs in Fleisch, welche aus den Isomerisierungsreaktionen von GO und MGO mit Lysin hervorgehen. Die Analyse von proteingebundenen AGEs erforderte das Vorliegen der einzelnen (modifizierten) Aminosäuren und damit verbunden die vorhergehende Spaltung der

Peptidbindungen. Neben der salzsauren Proteinhydrolyse (6 M HCl, 110°C, 20 h) stellt die (mehrstufige) enzymatische Hydrolyse eine Alternative dar, welche beim Nachweis von säurelabilen AGEs Anwendung findet.³⁷² Die Etablierung einer enzymatischen Proteinhydrolyse von komplexen Lebensmitteln gelang bisher jedoch nur wenigen Arbeitsgruppen.^{55,217} Dies begrenzte somit auch das AGE-Spektrum in Fleisch überwiegend auf die säurestabilen Proteinmodifikationen CML und CEL (Tabelle 11). In der vorliegenden Arbeit trug die erfolgreiche enzymatische Proteinhydrolyse mittels Endo- und Exopeptidasen hingegen wesentlich zum mechanistischen Verständnis der nicht-enzymatischen Proteinmodifikation in Fleisch bei. So wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich neben den säurelabilen Amid-Strukturen GALA und *N*⁶-Lactoyllysin auch die *crosslink*-Proteinmodifikationen GOLA, MOLA, GOLD, MOLD sowie die neuartigen Amidin-AGEs *glyoxal lysine amidine* (GLA) und *methylglyoxal lysine amidine* (MGLA) erstmalig in Fleisch quantifiziert.³⁷³ Die Bedeutung dieser *crosslink*-AGEs in Lebensmitteln wird speziell in Kapitel 4.3 diskutiert.

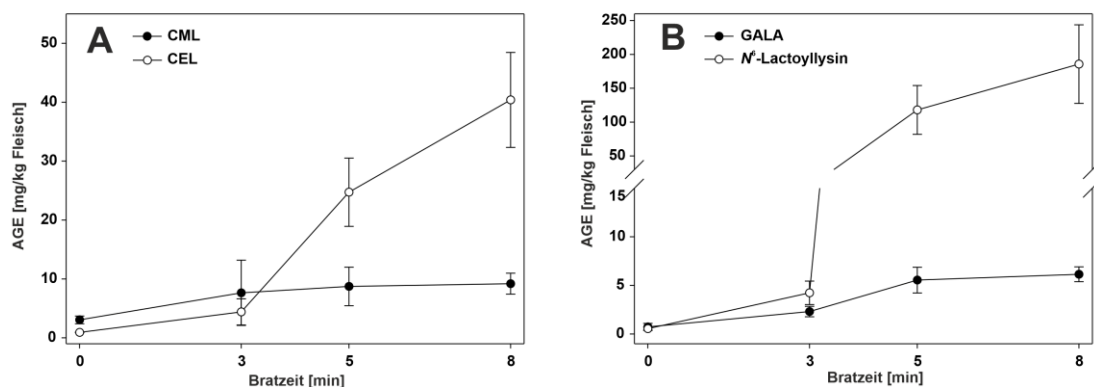


Abbildung 29: Bildung von GO- und MGO-AGEs während des Grillens von Schweinehackfleisch.

In rohem Fleisch stellte CML die quantitativ bedeutendste AGE-Proteinmodifikation dar und überstieg mit 3,0 mg/kg die Gehalte von CEL (0,9 mg/kg) etwa um das Dreifache. Das Braten führte zu einer Zunahme von beiden AGEs, welche sich durch die thermisch induzierten Kondensationen von 1,2-Dicarbonylen mit Lysin erklärten. Die von MGO abgeleitete Lysin-Modifikation CEL stieg steil an und erreichte nach 8 min Bratzeit ca. 40 mg/kg, während CML nur einen moderaten Anstieg verzeichnete und nach 5 min Bratzeit bei einem Gehalt von ca. 9 mg/kg konstant blieb (Abbildung 29). In der Literatur wurde das relative Verhältnis von CML zu CEL in zubereitetem Schweinefleisch kontrovers diskutiert, wobei die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Absolutwerte mit den bisher bekannten Schwankungsbreiten vergleichbar waren (Tabelle 11). Während einige Autoren von doppelten bis dreifach höheren Konzentrationen von CML gegenüber CEL berichteten, führten andere nahezu umgekehrte Verhältnisse auf.³⁷⁴⁻³⁷⁷ Dies wurde auf die grundsätzlich unterschiedlichen Bedingungen der Prozessierung wie Temperatur und Zeit sowie die Art des verwendeten Fleisches

zurückgeführt. Beispielsweise zeigte Yu et al., dass Sterilisieren (121°C, 30 min) zu einem Verhältnis von CML zu CEL von ca. 1:2 führte, während es nach einer Pasteurisierung (85°C, 4 h) nahezu umgekehrt war. Bei ca. 60% der Fleischprodukte, welche von Scheijen et al. analysiert wurden, waren die Gehalte von CEL größer als von CML.¹⁵ Ein klarer mechanistischer Hintergrund für diese unterschiedlichen Verhältnisse von GO- und MGO-AGEs wurde in der Literatur bisher jedoch nicht dargelegt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis von CML gegenüber CEL von 3:1 (rohes Fleisch) durch das Grillen deutlich auf die Seite von CEL verschoben, sodass nach 8 min ein Verhältnis von 1:5 resultierte. Die Bildung von CML erfolgt neben der Kondensation von Lysin mit GO zusätzlich aus der oxidativen Fragmentierung von Amadori-Produkten, während MGO bisher die einzige quantitativ bedeutende Vorläuferstruktur von CEL darstellte (Kapitel 2.3). Interessanterweise ging CEL auch in einem Silica-Modellsystem aus der Reaktion von Lysin mit Lactat beim quasi wasserfreien Erhitzen (180°C) hervor, jedoch sind diese drastischen Reaktionsbedingungen nicht mit den üblichen Prozessierungs-Bedingungen von Lebensmitteln vergleichbar.³⁷⁸

Die nachfolgende Analyse der für GO und MGO charakteristischen Amid-Strukturen GALA und N⁶-Lactoyllysin, als auch der *crosslink*-AGEs (Kapitel 4.3.2.2) bestätigten den steileren Kurvenverlauf von MGO-AGEs während des Bratprozesses (Abbildung 29), welcher durch eine deutlich höhere Bildung von MGO gegenüber GO erklärt werden muss.

Tabelle 11: Konzentrationen von CML und CEL in rohem sowie zubereitetem Fleisch.

Matrix	Prozessierung	rohes Fleisch		prozessiertes Fleisch		Literatur
		CML	CEL	CML	CEL	
[mg/kg]						
Rindfleisch	Sterilisieren (121°C, 10 min)	4,4	3,9	13,0	11,7	
Schweinefleisch		2,9	1,7	9,5	3,5	³⁷⁴
Hähnchen		2,5	1,3	7,7	3,7	
Rindfleisch	Grillen (232°C, 16 min)	2,1	n.b.	21,8	n.b.	
	Backen (177°C, 45 min)			14,3		³⁷⁵
Schweinefleisch	Grillen, (232°C, 14 min)	2,0	n.b.	20,4	n.b.	
	Backen (177°C, 35 min)			12,5		
Schweinefleisch	Sterilisieren (121°C, 10 min)			11,7	5,9	³⁷⁶
	Sterilisieren (121°C, 30 min)	2,3	1,6	17,0	8,7	
Schweinefleisch	Pasteurisieren (85°C, 4 h)			22,3	9,9	³⁷⁷
	Sterilisieren (121°C, 30 min)	6,2	2,3	18,4	32,7	

Bisher war in der Literatur nur wenig über die Konzentrationen von GO und MGO in Fleischprodukten sowie deren Veränderungen während der Zubereitung bekannt. Roldan et al. untersuchte Maillard-Reaktionsprodukte in zubereiteter Lammlende, jedoch lagen GO und MGO unterhalb der Nachweisgrenze von 1 mg/kg.³⁷⁹ Maasen et al. hingegen quantifizierte in einer Reihe von Fleischprodukten höhere Gehalte an MGO (1,6-3,9 mg/kg) im direkten

Vergleich zu GO (0,3-2,6 mg/kg), wobei dies durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden konnte.⁵³

Für ein weitergehendes Verständnis wurden in der vorliegenden Arbeit die Gehalte an MGO und GO mittels HPLC-MS/MS untersucht. Die Analytik dieser 1,2-Dicarbonyl-Strukturen wird durch deren Reaktivität erschwert und erfordert allgemein eine Derivatisierung der entsprechenden wässrigen Lebensmittel-Extrakte, welche in der vorliegenden Arbeit mittels *o*-Phenylendiamin unter Ausbildung der respektiven stabilen Chinoxaline erfolgte. Die direkte Quantifizierung der 1,2-Dicarbonylverbindungen in den Fleischproben bestätigte auch direkt die stärkere Zunahme von MGO gegenüber GO beim Erhitzen (Abbildung 30). Während in rohem Fleisch ein Verhältnis von GO zu MGO von ca. 4:1 vorlag, führte das Braten zu einer Abnahme von GO um ca. 30%, welche durch die Folgereaktionen sowie der Ausbildung von AGEs erklärt werden kann. Prinzipiell geht MGO gleichermaßen Reaktionen mit beispielsweise Proteinen ein, dennoch war ein nahezu linearer Anstieg von MGO während der gesamten Bratzeit feststellbar. Dies muss durch die Neubildungen von MGO aus Präkursoren erklärt werden, welche die Folgereaktionen deutlich überstiegen. Nach 8 min Bratzeit wurde etwa die doppelte Menge MGO gegenüber GO quantifiziert. In den gebratenen Fleischproben lagen die Gehalte von GO hingegen stets unterhalb der Anfangskonzentration des rohen Fleisches, wodurch auch ein geringerer Anteil für Folgereaktionen mit Proteinen unter Ausbildung von AGEs zur Verfügung stand.

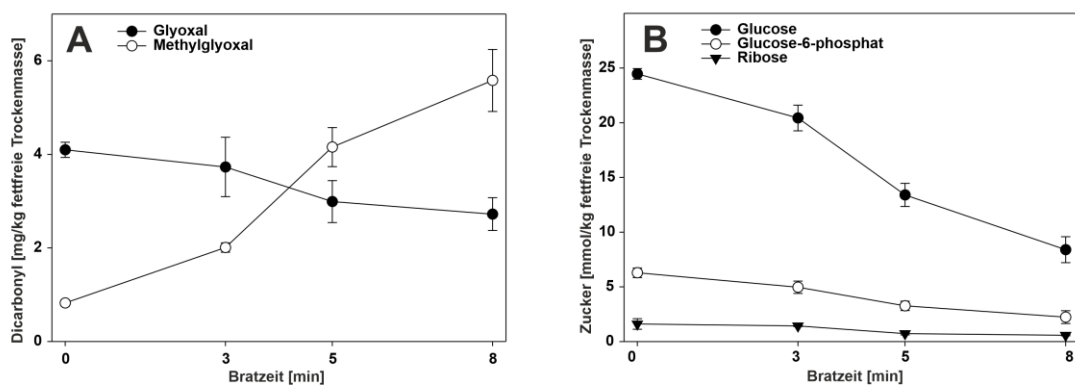


Abbildung 30: Veränderungen der Konzentrationen von 1,2-Dicarbonylen (A) sowie Kohlenhydraten (B) während des Grillens von Schweinehackfleisch.

Beide 1,2-Dicarbonylverbindungen werden durch die Maillard-katalysierten Fragmentierungen von Zuckern gebildet, wobei für ein weitergehendes Verständnis die Kohlenhydrate in rohem und gebratenem Fleisch analysiert wurden. Hierbei wurden wässrige Extrakte der Fleischproben mittels 1-Naphtylamin reduktiv behandelt, wobei die Carbonylgruppen der vorhandenen Zucker so durch einen unpolaren, als auch fluoreszierenden Rest modifiziert wurden.³⁸⁰ Dies ermöglichte die parallele Analytik mittels *reversed phase* (RP)-HPLC sowohl mit Fluoreszenz- als auch massenspektrometrischer Detektion. In Übereinstimmung mit der Literatur stellten Glucose, Glucose-6-phosphat und

Ribose die quantitativ bedeutendsten Kohlenhydrate in rohem Schweinehackfleisch dar (Abbildung 30).^{381–383} Verschiedene Reaktionsprodukte aus Ribose und Cystein ergeben in gebratenem Fleisch die produkttypischen Aromakomponenten.^{384,385} Die Bildung von Ribose im Fleisch lässt sich mechanistisch aus Adenosintriphosphat erklären, welches während der Fleischreifung durch eine Reihe von enzymatischen Dephosphorylierungs- und Deaminierungsreaktionen zu Inosin-Monophosphat umgewandelt wird. Die anschließende Hydrolyse führt zur Bildung von Ribose-5-phosphat bzw. Ribose, wobei grundsätzlich beide Strukturen potente Reaktionspartner hinsichtlich der Maillard-Reaktion darstellen.^{386,387} Die Bildung von Glucose-6-phosphat erfolgt hingegen in der Initialphase der Glykolyse, bei der Glucose durch die Hexokinase zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird, welches über die Hexosephosphat-Isomerase mit Fructose-6-phosphat im Gleichgewicht steht.³⁸⁸ Das Braten führte gleichermaßen zu einer Abnahme von Glucose, Ribose und Glucose-6-phosphat auf ca. 30% der Anfangskonzentrationen. Für einen direkten Vergleich der Ausbeuten von CML und CEL, welche letztlich beide aus aminkatalysierten Abbaureaktionen von Kohlenhydraten hervorgehen, wurden verschiedene Zucker mit *N*²-*t*-Boc-Lysin bei 50°C in Phosphatpuffer (pH 7,4) inkubiert. Die Reaktivität von Kohlenhydraten ist von der Verfügbarkeit der offenkettigen Struktur abhängig, wobei für die Bildung von AGEs galt Pentosen > Hexosen >> Dissacharide.³⁸⁹ In allen Modellsystemen unter Beteiligung von *N*²-*t*-Boc-Lysin und den entsprechenden reduzierenden Zuckern zeigte CML jedoch durchwegs eine schnellere Bildungskinetik gegenüber CEL (Tabelle 12). Unter der Voraussetzung, dass die grundsätzlichen Reaktivitätsunterschiede auch auf die Reaktionen im Fleisch während des Grillens übertragbar sind, lässt sich alleinig durch die Fragmentierung von Ribose oder Glucose nicht der Konzentrationsunterschied zwischen CEL und CML erklären. Die Zunahme von CEL bzw. MGO während des Bratens muss somit auf einen alternativen Bildungsweg zurückgeführt werden.

Tabelle 12: Bildung von CML und CEL in den Inkubationen von 40 mM *N*²-*t*-Boc-Lysin mit verschiedenen Zuckern (100 mM) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C nach 48 h.

Analyt	Ribose	Glucose	Maltose
	[mmol/mol Lysin]		
CML	37,8	6,8	3,0
CEL	2,6	0,2	0,003

In Lebensmitteln stellen DHAP und G3P, welche als Schlüsselintermediate der Glykolyse verstanden sind, wichtige Vorläuferstrukturen für MGO dar und werden beispielsweise während fermentativer Vorgänge im Zuge des Metabolismus von Hefen gebildet.⁵⁵ Von einer mechanistischen Sichtweise aus verläuft die Bildung von MGO hierbei durch die nicht-enzymatische Phosphatelimierung des Enolisierungsprodukts 3-Phospho-1,2-endiol

(Abbildung 31). Prinzipiell korrelierte die Bildung von MGO mit der Geschwindigkeit der Enolisierung, wobei diese bei G3P ca. 13 mal schneller verläuft als bei DHAP.⁴⁷ In einem wässrigen Modellsystem konnten beispielsweise 90% von G3P und 15% von DHAP bereits nach 2 h bei 37°C in Phosphatpuffer (pH 7,4) abgebaut werden.⁴⁷ In der Literatur wurden beide Triosephosphate bereits in Fleisch quantifiziert.^{390,391} Über deren Veränderungen während der Zubereitung von Fleisch war bisher jedoch nichts bekannt. Im Gegensatz zu den in der Literatur oftmals vorgestellten enzymatischen Methoden wurden G3P und DHAP in der vorliegenden Arbeit durch die bereits beschriebene selektive und sensitive massenspektrometrische Analyse nach reduktiver Aminierung mittels 1-Naphtylamin quantifiziert. In rohem Fleisch lag die Summe der Triosephosphate bei ca. 40 µmol/kg fettfreie Trockenmasse und das Grillen führte nach 8 min zu einem quantitativen Abbau. Unter der Annahme einer quantitativen Umwandlung von G3P und DHAP in MGO, könnten somit ca. 50% der freien MGO-Konzentrationen nach 8 min Bratzeit durch den Abbau der Triosephosphate erklärt werden (Abbildung 31).

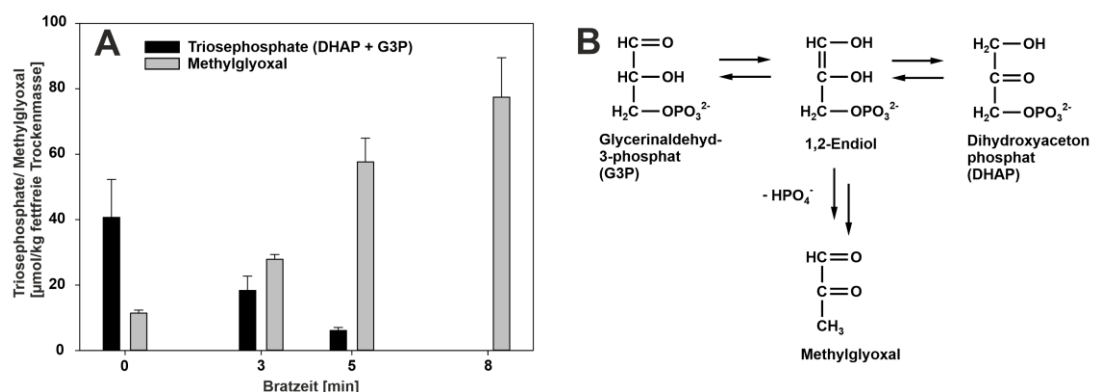


Abbildung 31: Veränderungen der Konzentrationen der Triosephosphate G3P und DHAP sowie Bildung von MGO beim Grillen von Schweinehackfleisch (A). Schematische Darstellung der Bildung von MGO aus Triosephosphaten (B).

Neben dem Abbau von Kohlenhydraten stellt die Lipidperoxidation in fettreichen Lebensmitteln wie Fleisch einen weiteren potentiellen Bildungsweg für GO und MGO dar (Kapitel 2.1.2.5). Beispielsweise führte das Erhitzen von einer Reihe an Fetten, inklusive Butter und Margarine bei Temperaturen von 200°C zu der dreifachen Menge an MGO im Vergleich zu GO.¹¹⁶ Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass die Lipidperoxidation eine weitere Erklärung für die höheren Gehalte von MGO in gebratenem Fleisch liefern könnte. Diese Hypothese konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit widerlegt werden. Der Beitrag der Lipidperoxidation hinsichtlich der Bildung von GO und MGO wurde umfassend in eigenständigen Experimenten evaluiert, welche in Kapitel 4.2.1 vorgestellt werden.

Zusammengefasst korrelierte der Abbau der Triosephosphate direkt mit der Freisetzung von MGO sowie der Bildung von MGO-AGEs in gebratenem Fleisch. Die Fragmentierung von G3P und DHAP stellten vermutlich den zentralen Bildungsweg von MGO in Fleisch dar und

prägten somit entscheidend das Glykierungsmuster von Fleischproteinen. Variierende Gehalte an endogen vorhandenen Triosephosphaten zwischen verschiedenen prozessierten Fleischprodukten könnte somit auch eine Erklärung für die bisher kontrovers diskutierte Bedeutung von MGO-AGEs in Fleisch sein.

4.1.2 Neuartiger Bildungsweg von N^6 -Lactoyllysin durch S-Lactoylglutathion in Fleisch

Innerhalb der in der vorliegenden Arbeit quantifizierten AGEs stellte N^6 -Lactoyllysin nach 8 min Bratzeit mit 186 mg/kg die bedeutendste Lysin-Modifikation dar und überstieg die Gehalte von CEL um das Fünffache. Dies stand in einem Widerspruch mit den relativen Konzentrationsverhältnis von CEL und N^6 -Lactoyllysin von etwa 10:1, welche sich aus wässrigen Modellsystemen von Lysin und MGO ergaben und auch auf Backwaren übertragbar war.⁵⁵ Während CEL bevorzugt durch die Kondensation von Lysin an die Keto-Funktion des Monohydrates gebildet wird, erfordert die Bildung von N^6 -Lactoyllysin hingegen einen Angriff auf die freie 1,2-Dicarbonyl-Struktur (Abbildung 40). MGO liegt in wässrigen Systemen jedoch überwiegend in Form des Monohydrats (56-70%) sowie Dihydrats (29-44%) vor, während die reaktive Dicarbonyl-Struktur nur zu etwa 1% vorhanden ist.^{392,393} Diese limitierte Verfügbarkeit der freien Dicarbonyl-Struktur von MGO könnte somit die geringeren Ausbeuten von N^6 -Lactoyllysin gegenüber CEL begründen. Die völlig unterschiedlichen Verhältnisse in gebratenem Fleisch deuteten hingegen darauf hin, dass der Großteil von N^6 -Lactoyllysin durch einen zusätzlichen Mechanismus gebildet werden muss. Hingegen könnte nur ein kleinerer Teil von N^6 -Lactoyllysin direkt auf die Reaktion von Lysin mit MGO zurückgeführt werden. Bisher waren die Modifikationen von Plasma-, Augenlinsen- und Lebensmittel-Proteinen durch N^6 -Lactoyllysin bekannt, welche überwiegend durch die Reaktionen von MGO mit Lysin-Seitenketten erklärt wurden.^{11,30,31,394} Die amininduzierte β -Fragmentierung von Kohlenhydraten stellt einen zweiten bekannten Bildungsweg von N^6 -Lactoyllysin dar, welcher jedoch gegenüber der Bildung aus MGO quantitativ eine deutlich geringere Bedeutung hat.³⁰ Prinzipiell liegen in Muskeln post-mortem relativ hohe Gehalte von L-Lactat vor, welche bis zu 0,1-0,8% erreichen.^{391,395} Formal stellt L-Lactat eine potentielle Vorläuferstruktur von N^6 -Lactoyllysin dar. Die thermodynamisch ungünstigen direkten Kondensationen von Carbonsäuren und Aminen unter Ausbildung von Amid-Strukturen wurden jedoch nur unter quasi wasserfreien Bedingungen und hohen Temperaturen beschrieben, während in verdünnten wässrigen Systemen grundsätzlich kein Reaktionsumsatz stattfand.^{11,396} Beispielsweise wurde die Bildung von N^2 -Lactoylphenylalanin aus Phenylalanin und Lactat bei 100°C in konzentrierter wässriger Lösung beschrieben.³⁹⁷ Im Hinblick auf die Kerntemperatur von 95°C sowie die deutliche Aufkonzentrierung der nichtflüchtigen Inhaltstoffe während des Bratens (Abbildung 28) könnte auch die Acylierung von Lysin durch Lactat in einem sehr geringen Maße zu N^6 -Lactoyllysin im Fleisch geführt

haben. Diese direkte Kondensationsreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht. Auf der anderen Seite wurden aromapotenten N^2 -Lactoyl-Aminosäurederivate in fermentierten Produkten wie Käse, Sauerkraut oder gereiften Schinken nachgewiesen, welche keine Prozessierung durch hohe Temperaturen durchliefen. Die Bildungen dieser Aminosäure-Modifikationen sind mechanistisch nicht abschließend verstanden, jedoch sind vermutlich mikrobielle Enzyme für die enzymatisch katalysierte Acylierung von freien Aminosäuren durch Lactat verantwortlich.^{398–402} *In vivo* wurde die Bildung von N^2 -Lactoylphenylalanin hingegen auf die enzymatische Aktivität der *cytosolic nonspecific dipeptidase 2* (CNDP2) zurückgeführt, welche im Sinne einer umgekehrten Proteolyse die Verknüpfung von Lactat und Phenylalanin katalysiert.⁴⁰³ In physiologischen Systemen soll N^6 -Lactoyllysin auch aus den Reaktionen von aktivierten Lactoyl-Thioestern mit Lysin hervorgehen. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Reaktionswege postuliert: (I) Bildung von *S*-D-Lactoylglutathion aus MGO und (II) Bildung von L-Lactoyl-CoA aus L-Lactat (Abbildung 32).^{394,404}

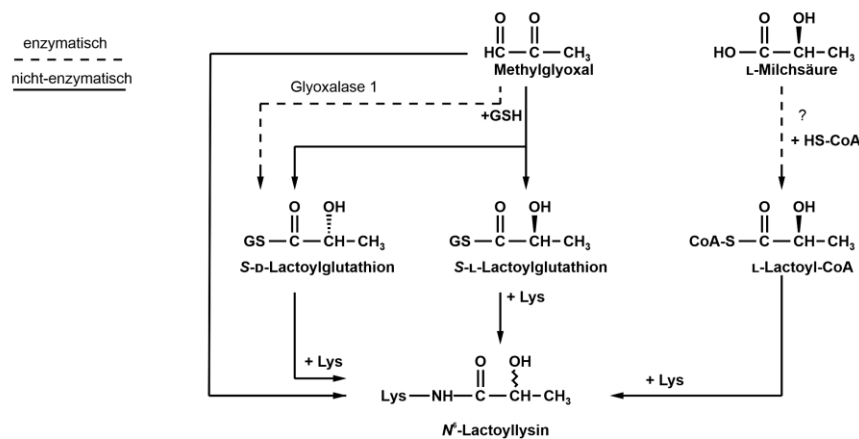


Abbildung 32: Bildungswege von N^6 -Lactoyllysin durch die Reaktionen von Lysin mit MGO bzw. Milchsäure.

Die Acylierungen von Lysin durch Acyl-CoA Thioester stellen einen der wichtigsten Bildungsmechanismen für Lysin-Amid-Proteinmodifikationen in physiologischen Systemen dar und erfolgen durch parallele enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionswege (Kapitel 2.3.2).¹⁸⁴ In Analogie zu dieser Reaktionsfolge würde Lactoyl-CoA mit Lysin direkt zu N^6 -Lactoyllysin kondensieren, jedoch ist über die Bedeutung dieses Reaktionswegs in Lebensmitteln nichts bekannt. Lactoyl-CoA kann *in vitro* aus Lactat und Acetyl-CoA durch bakterielle Lactat CoA-Transferasen gebildet werden und findet auch biotechnologisch bei der Herstellung von Lactat-Copolymeren Anwendung.^{405,406} *In vitro* katalysierten p53 und p300 die enzymatische Acylierung von Histon-Proteinen durch L-Lactoyl-CoA und in Zellkultur konnte unter Verwendung von isotoopenmarkiertem L-Lactat dieses zweifelsfrei als eine Vorläuferstruktur für N^6 -Lactoyllysin bestätigt werden.³⁹⁴ Der genaue enzymatische Aktivierungsmechanismus von Lactat ist bisher jedoch immer noch ungeklärt. Der erstmalige direkte Nachweis von Lactoyl-CoA in Gewebeproben erfolgte in Mäuseherzen, jedoch waren

die gemessenen Konzentrationen (0,0172 nmol/g Feuchtgewicht) im Vergleich zu Acetyl-CoA (5,77 nmol/g) bzw. Propionyl-CoA (0,476 nmol/g) um Faktoren von 335 bzw. 27 geringer.⁴⁰⁷ S-D-Lactoylglutathion wird hingegen enzymatisch aus GSH und MGO unter Beteiligung von Glyoxalase 1 gebildet, wobei dieses Enzym die stereoselektive Isomerisierung des zunächst nicht-enzymatisch gebildeten Thiohalbacetals katalysiert. Glyoxalase 2 hydrolysiert anschließend diesen Thioester unter Freisetzung von D-Lactat (Abbildung 33).⁴⁰⁸ Beide Enzymkomplexe zusammen stellen das Glyoxalase-System dar, welches eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Detoxifikation von MGO *in vivo* einnimmt. Es weist ein breites Substratspektrum auf und kann neben MGO auch weitere 1,2-Dicarbonylmetabolisieren.^{409,410} Das intermediär gebildete S-D-Lactoylglutathion wurde bereits in Gewebeproben von Ratten im Bereich von 2,8-8,7 nmol/g sowie in Blutproben von gesunden Menschen (~12-16 μ M) bzw. Ratten (~3,5-5,2 μ M) quantifiziert und zeigte in der diabetischen Gruppe eine Zunahme um Faktoren von 1,3-1,7 im Vergleich zur Kontrollgruppe.⁴¹¹⁻⁴¹³ In Zellkultur führte der *knockout* von Glyoxalase 2 zu einer Akkumulation von S-D-Lactoylglutathion, welche direkt eine gesteigerte Modifikation von Proteinen durch N⁶-Lactoyllysin zur Folge hatte.⁴⁰⁴ Auf Grundlage von Modellinkubationen wäre gleichermaßen die (nicht-enzymatische) Bildung von N⁶-Lactoyllysin durch Lactoyl-CoA als auch durch S-D-Lactoylglutathion erklärbar.^{394,404} Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf die Untersuchung der Lysin-Acylierung durch S-D-Lactoylglutathion.

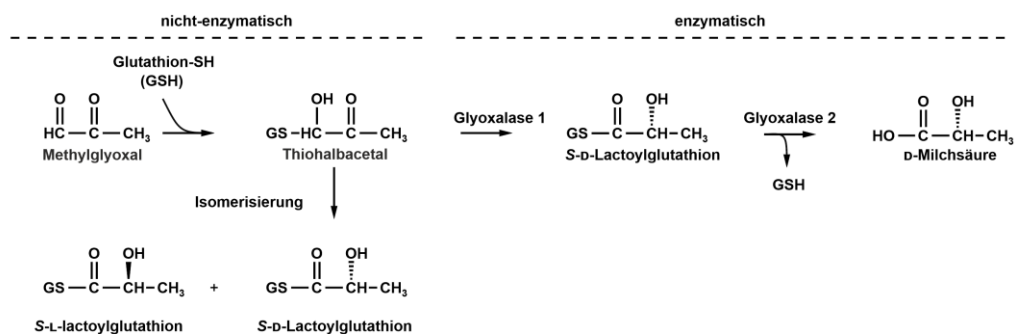


Abbildung 33: Darstellung der enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktion von MGO mit GSH.

Tatsächlich konnte S-D-Lactoylglutathion erstmalig massenspektrometrisch in wässrigen Extrakten von rohem Hackfleisch nachgewiesen sowie quantifiziert werden. Entgegen der Erwartung nahm die Konzentration dieses Thioesters während des Bratens jedoch zu und es konnte zusätzlich ein zweiter Peak mit identischen Fragment-Spektrum identifiziert werden (Abbildung 34). Der enzymatisch katalysierte Bildungsweg durch Glyoxalase 1 konnte hierbei jedoch ausgeschlossen werden, da unter den harschen Bedingungen des Bratens grundsätzlich alle Proteine und Enzyme denaturiert wurden. In der Literatur wurde bereits die nicht-enzymatische Reaktion von MGO mit N²-Acetylcystein beschrieben, welche zunächst zur Ausbildung eines Thiohalbacetals führte. Dieses isomerisierte folgend zu dem

S-Lactoylcystein-Derivat, wobei dies entsprechend der nicht-enzymatischen Reaktion jedoch nicht stereoselektiv verlaufen müsste.^{414,415} In Analogie könnte S-Lactoylglutathion auch über einen nicht-enzymatischen Reaktionsweg gebildet werden, der zur Ausbildung der S-D- als auch S-L-Lactoylglutathion-Isomere führen würde (Abbildung 33). Eine analytische Trennung von diesen Diastereomeren sollte auch auf achiralen Chromatographiesäulen möglich sein und würde das Auftreten des zweiten Peaks im Chromatogramm erklären.⁴¹⁶ Die Identität des potentiellen S-L-Lactoylglutathions konnte durch weitere Inkubationsexperimente (50°C, 100 mM Phosphat, pH 6,0) mit GSH und MGO sowie D- bzw. L-Methylactat auf Grundlage von massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigt werden. In rohem Fleisch lag erwartungsgemäß lediglich das S-D-Lactoylglutathion-Isomer vor, welches in den ersten Minuten abreagierte, während folgend beide Diastereomere gleichermaßen nicht-enzymatisch nachgebildet wurden (Abbildung 34).

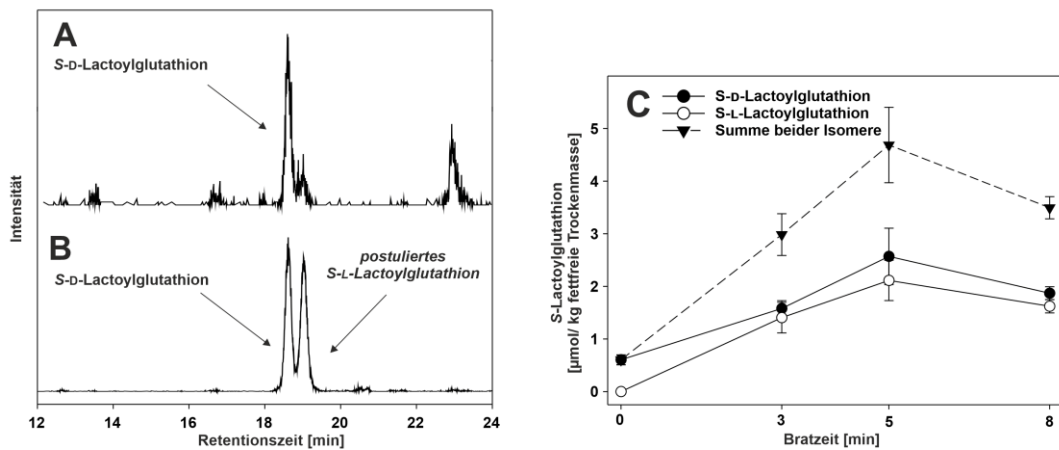


Abbildung 34: Darstellung eines HPLC-MS/MS Chromatogramms [m/z 380 \rightarrow 233 ($M+H^+$)] eines wässrigen Extraktes von rohem (A) und 5 min gegrilltem Schweinehackfleisch (B). Einfluss der Bratzeit auf die Konzentrationen von Lactoylglutathion-Isomeren in Schweinehackfleisch (C).

Nachfolgend wurden in Modellsystemen (pH 7,4 und 50°C) äquimolare Mengen MGO oder S-D-Lactoylglutathion mit N^2 -t-Boc-Lysin inkubiert und die Effizienz beider Strukturen hinsichtlich der Bildung von N^6 -Lactoyllysin verglichen. S-D-Lactoylglutathion führte gegenüber MGO zu etwa 90-fach höheren Konzentrationen an N^6 -Lactoyllysin (Abbildung 35), wobei dies die bisher in der Literatur beschriebene hohe Reaktivität von S-D-Lactoylglutathion gegenüber Lysin bestätigte.⁴⁰⁴ In einer zweiten Modellinkubation wurde der pH-Wert (6,0) sowie die relativen Konzentrationsverhältnisse von MGO oder S-D-Lactoylglutathion von 22:1 vorgegeben, um direkt die relativen Verhältnisse dieser Strukturen in 5 min gegrilltem Fleisch abzubilden. Trotz der deutlich geringeren eingesetzten Menge an S-D-Lactoylglutathion wurde in der vergleichenden Modellinkubation etwa die achtfach höhere Menge an N^6 -Lactoyllysin quantifiziert (Abbildung 35). Um nachfolgend auch zusätzlich den Beitrag des potentiellen S-L-Lactoylglutathions zur Bildung von N^6 -Lactoyllysin zu berücksichtigen, wurden in parallelen Inkubationen ein Verhältnis von

S-D-Lactoylglutathion gegenüber MGO von 1:12 eingestellt. Dies führte im direkten Vergleich zur MGO-Kontrollinkubation zu etwa dreizehnfach höheren Gehalten an N^6 -Lactoyllysin. Unter der Annahme, dass die allgemeinen Reaktivitäten zwischen den Modellinkubationen und dem Grillen von Fleisch vergleichbar sind, könnte dieser neuartige Acylierungsmechanismus die hohen Konzentrationen von N^6 -Lactoyllysin (186 mg/kg) im Fleisch weitestgehend mechanistisch erklären. Der Großteil von N^6 -Lactoyllysin (173 mg/kg, 93%) ginge so durch die bisher im Fleisch unbekanntenen Reaktionen von Lysin mit S-D- und S-L-Lactoylglutathion hervor, während nur etwa 13 mg/kg auf die direkten Reaktionen von Lysin mit MGO zurückgeführt werden könnte.

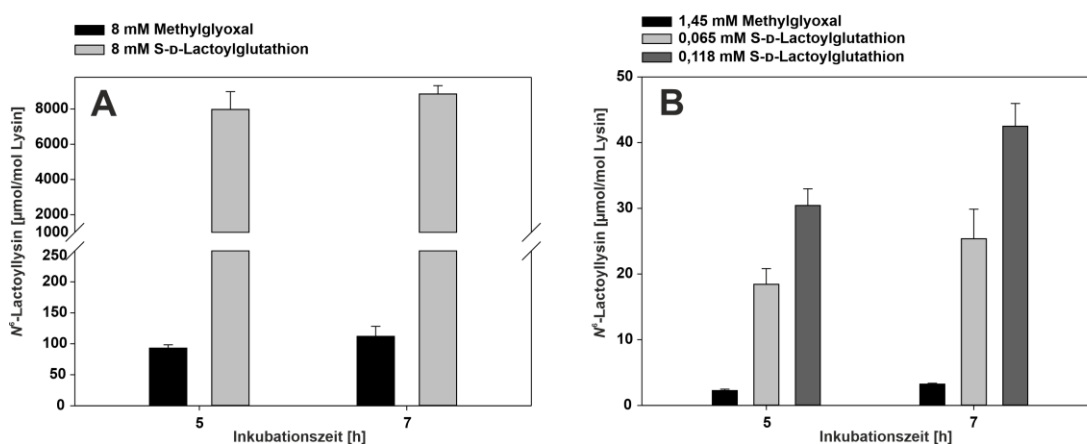


Abbildung 35: Bildung von N^6 -Lactoyllysin durch die Reaktion von Lysin mit MGO bzw. S-D-Lactoylglutathion. Inkubation von 40 mM N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphat (pH 7,4) mit 8 mM MGO bzw. 8 mM S-D-Lactoylglutathion bei 50°C (A). Inkubation von 40 mM N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphat (pH 6,0) mit 1,45 mM MGO bzw. 0,065 mM (22:1) und 0,118 mM (12:1) S-D-Lactoylglutathion bei 50°C (B).

Die durch Thiol-Verbindungen katalysierte nicht-enzymatische Bildung von N^6 -Lactoyllysin wurden in nachfolgenden Experimenten nochmals bestätigt, wobei auch unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen untersucht wurden. In Inkubationen von N^2 -*t*-Boc-Lysin mit MGO erhöhte der Zusatz von N^2 -Acetyl-Cystein oder GSH in parallel durchgeführten Experimenten gleichermaßen die Ausbeuten von N^6 -Lactoyllysin (Tabelle 13).

Tabelle 13: Bildung von N^6 -Lactoyllysin in Inkubationen von 40 mM N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer unter Zusatz von 8 mM N^2 -Acetyl-Cystein bzw. GSH nach 24 h.

	Inkubations-System		
	8 mM MGO	8 mM MGO + 0,8 mM GSH	8 mM MGO + 0,8 mM N^2 -Acetyl-Cystein
	N^6 -Lactoyllysin [µmol/mol Lysin]		
pH 7,4, 37°C	47 ± 3	80 ± 2	70 ± 1
pH 6,0, 50°C	39 ± 5	59 ± 8	56 ± 11

Der katalytische Effekt von N^2 -Acetylcystein hinsichtlich der Modifikation von Lysin durch GO wurde auch in Modellsystemen beschrieben, welche gleichzeitig Lysin und Arginin

enthielten.⁴¹⁷ In Inkubationen ohne *N*²-Acetylcystein wurde überwiegend Arginin modifiziert. Hingegen forcierte der Zusatz der Thiol-Verbindung die Bildung von CML, während Arginin dabei nahezu unmodifiziert blieb.⁴¹⁷ Nachfolgende Arbeiten müssen nun den Einfluss der Thiol-Katalyse auf die nicht-enzymatische Proteinmodifikation evaluieren. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten katalysierten Bildungen von Proteinmodifikationen durch Thiol-Verbindungen müssen jedoch im Kontext der Lebensmittel-Prozessierung betrachtet werden. In physiologischen Modellsystemen hingegen konnte beispielsweise GSH in Verbindung mit Glyoxalase 2 auch den Proteinmodifikationen durch Acetyl-CoA oder Succinyl-CoA entgegenwirken.²⁰⁰ Dies wurde durch die initiale Umacylierung von z.B. Acetyl-CoA auf GSH unter Bildung von Acetyl-Glutathion erklärt, welches dann als Substrat von Glyoxalase 2 hydrolysiert werden kann. Diesem Mechanismus könnte eine Rolle bei der nicht-enzymatischen Regulation der Lysin-Acylierung zu Teil sein.²⁰⁰

Zusammengefasst konnte *N*⁶-Lactoyllysin als die bisher quantitativ bedeutendste Lysin-AGE-Proteinmodifikation in Fleisch quantifiziert werden. Eine mechanistische Erklärung des Hauptbildungswegs lieferte die nicht-enzymatische Lysin-Acylierung durch S-Lactoylglutathion, welches ebenfalls durch die nicht-enzymatische Reaktion von GSH mit MGO hervorging.

4.2 Beitrag der Lipidperoxidation zur Proteinmodifikation bei der Zubereitung von Lebensmitteln

4.2.1 Bildung von GO und MGO durch die Lipidperoxidation von ungesättigten Triglyceriden

Prinzipiell gehen GO und MGO sowohl aus Fragmentierungsreaktionen von Kohlenhydraten als auch Lipiden hervor. Die quantitative Bedeutung der Lipidperoxidation hinsichtlich der Bildung von GO und MGO im direkten Vergleich zur Maillard-Reaktion ist ein in der Literatur kontrovers diskutiertes Themenfeld. In verschiedenen wässrigen Systemen wurden die Ausbeuten von CML aus der Kohlenhydrat-Fragmentierung sowie Lipidperoxidation in Gegenwart von Lysin verglichen. So zeigte Lima et al., dass in den vergleichenden Inkubationen von Casein mit Arachidonsäure bzw. Glucose bei 95°C die Gehalte von CML bei letzteren um Faktoren von etwa 15 höher waren.¹²⁰ Weitere Studien von Yu et al. zeigten deutlich höhere Gehalte von CML durch den Abbau von Glucose im Vergleich zu Linolsäure, wobei jeweils dieselben Massen mit Fleischproteinen bei 50°C bzw. 37°C inkubiert wurden.^{119,122} Von einer mechanistischen Sichtweise aus geht CML in Inkubationen von Lipiden tatsächlich spezifisch aus der Reaktion von Lysin mit GO hervor, welches durch die Lipidperoxidation gebildet wurde. Die Fragmentierung von Amadori-Produkten stellt hingegen einen zusätzlichen Hauptbildungsweg von CML beim Maillard-katalysierten Abbau von Kohlenhydraten dar (Kapitel 2.3.1.4). Die alleinige Quantifizierung von CML ermöglicht somit keinen direkten Rückschluss auf die GO-Bildung in Kohlenhydrat-Inkubationen.¹⁸⁹ Umso erstaunlicher waren die Ergebnisse von Fu et al., welche von etwa 25-fach höheren Gehalten an CML in Inkubationen von RNase mit Arachidonsäure bei 37°C im direkten Vergleich zu äquimolaren Mengen an Glucose berichteten.¹¹⁸

Tabelle 14: Fettsäurezusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzenöle sowie der Lipidfraktion des Mehls.

Fettsäure	Leinöl	Sonnenblumenöl	Kokosfett	Mehl ¹
Anteil der Fettsäure (%)				
Laurinsäure	< LOD ²	< LOD	43,0	0,1
Myristinsäure	0,5	0,5	19,5	0,4
Palmitinsäure	6,1	7,1	10,6	16,7
Stearinsäure	5,1	4,5	9,7	0,1
Ölsäure	18,6	26,8	2,1	9,7
Linolsäure	12,5	58,4	0,6	56,3
Linolensäure	54,4	0,9	0,6	3,5
Arachidonsäure	< LOD	< LOD	< LOD	0,1

¹ Fettsäurezusammensetzung der Lipidfraktion des Weizenmehls, ²limit of detection, Nachweisgrenze

In der vorliegenden Arbeit wurden in verschiedenen Modellsystemen die Bildungen von GO, MGO, MDA sowie abgeleiteter Aminosäure-Addukte während der thermisch induzierten Lipidperoxidation von Leinöl, Sonnenblumenöl sowie Kokosfett untersucht. Die Auswahl der Öle erfolgte aufgrund des unterschiedlichen Anteils an ungesättigten Fettsäuren, wobei in der

Literatur bereits die Bildung von GO, MGO und MDA direkt mit der steigenden Unsättigung der Fettsäuren in verschiedenen Modellsystemen korreliert wurden (Kapitel 2.1.2.5 und Kapitel 2.1.2.6). Die Fettsäurezusammensetzung der entsprechenden Triglyceride wurde nach Derivatisierung mittels Trimethylsulfoniumhydroxid gaschromatographisch bestimmt (Tabelle 14). In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl rein thermische Inkubationen (150°C, 6 h), als auch wässrige Emulsionen (50°C, 96 h) als stark vereinfachte Modellsysteme genutzt. Daneben wurde auch die Fettsäurezusammensetzung von Teigen moduliert, mit welchen Waffeln gebacken wurden. Letzterer Ansatz diente als ein komplexes Lebensmittelmodell, welches unter streng definierten Bedingungen durchgeführt werden konnte. Dies war für die Interpretation der mechanistischen Zusammenhänge essentiell. Der experimentelle Aufbau sowie die wissenschaftliche Diskussion wurden ausführlich in *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70 (33), 10271-10283 beschrieben und folgend werden nur Teile der Ergebnisse vorgestellt.⁴¹⁸ Allgemein korrelierte die gebildete Menge der Carbonylverbindungen mit dem Anteil an ungesättigten Fettsäuren der entsprechenden Lipide (Leinöl >> Sonnenblumenöl > Kokosfett), welche mit der bevorzugten radikalischen Oxidation von hoch ungesättigten Fettsäuren wie Linolensäure (~54% in Leinöl) einhergeht (Kapitel 2.1.2). Eine zentrale Fragestellung war, welchen Beitrag die Lipidperoxidation auf die Bildung von stabilen Proteinmodifikationen hat. Prinzipiell kann sich diese auf zwei Arten darstellen: (I) Bildung der 1,2-Dicarbonylverbindungen GO und MGO und Erhöhung der *steady-state* Konzentrationen und folgend auch AGEs oder (II) Fragmentierung zu verschiedenen (lipidspezifischen) Carbonyl-Strukturen, welche in Konkurrenzreaktionen mit Ersteren um nucleophile Protein-Seitenketten treten.

In einem ersten Modell wurden die verschiedenen Öle thermisch bei 150°C für bis zu 6 h inkubiert. Aufgrund der Flüchtigkeit von Carbonyl-Strukturen in quasi wasserfreien Systemen wurde in der vorliegenden Arbeit die Oxidation in geschlossenen Glasgefäßen durchgeführt. Der sauerstoffhaltige Luftraum war somit von der Geometrie der verwendeten Gefäße bestimmt. Nach einer definierten Inkubationszeit (20-300 min) erfolgte eine wässrige Extraktion der Lipidphase, wobei die wässrige Phase nach entsprechender Derivatisierung mit *o*-Phenylendiamin hinsichtlich des Gehalts an 1,2-Dicarbonylen mittels HPLC-MS/MS untersucht wurde. GO und MGO stellen etablierte Produkte der Lipidperoxidation dar (Kapitel 2.1.2.5), wobei in der vorliegenden Arbeit die Bildung von GO stets MGO in den Modellsystemen überstieg. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist es somit unwahrscheinlich, dass ein bedeutender Teil der Zunahme von MGO während des Bratens von Fleisch auf die Lipidperoxidation zurückgeführt werden könnte (Kapitel 4.1). Das Maximum an GO (~2 mg/kg) und MGO (~0,8 mg/kg) wurde in den Leinöl-Inkubationen bereits nach 40 min erreicht (Abbildung 36). Nach Durchschreiten des Maximums zeigten beide 1,2-Dicarbonyl-Strukturen gleichermaßen eine stetige Abnahme, welche auf Folgereaktionen wie Oxidationen

oder Kondensationsreaktionen mit reaktiven Verbindungen erklärt werden könnte. Sonnenblumenöl zeigte einen analogen Kurvenverlauf und erreichte im Vergleich zu Leinöl zeitverzögert annähernd gleiche Gehalte an GO ($\sim 1,8$ mg/kg), während MGO ($\sim 0,3$ mg/kg) weniger als die Hälfte erreichte. Kokosfett hingegen zeigte nur Spuren von GO, während MGO eine geringe Zunahme zeigte. Dies bestätigte nochmals die Bedeutung von ungesättigten Strukturelementen hinsichtlich der Bildung dieser 1,2-Dicarbonylverbindungen. Dennoch ist der mechanistische Ursprung von MGO aus überwiegend gesättigten Lipiden bisher nicht abschließend verstanden, wobei in zukünftigen Experimenten neben den Fettsäureresten auch der Glycerin-Grundkörper betrachtet werden sollte.⁴¹⁹

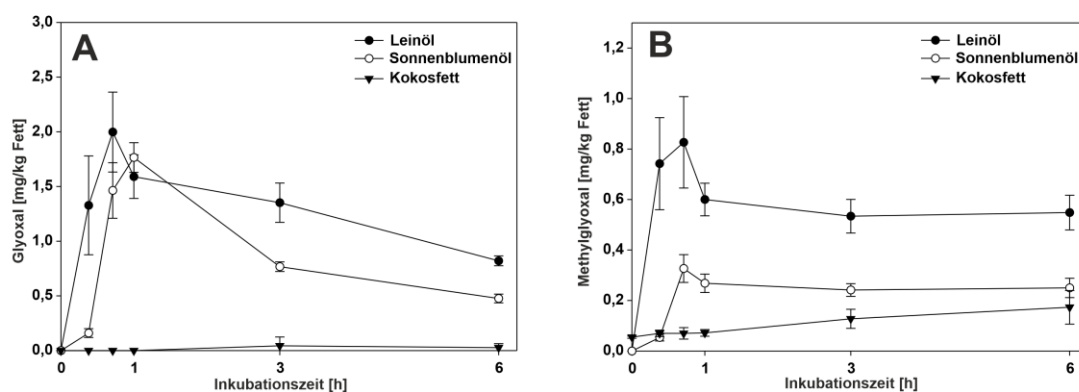


Abbildung 36: Bildung von GO (A) und MGO (B) beim wasserfreien Erhitzen von Leinöl, Sonnenblumenöl und Kokosfett bei 150°C.

In einem zweiten experimentellen Aufbau wurde ein wässriges Inkubations-System gewählt, welches die Komplexität des Oxidationsmodells durch den Zusatz von N^2 -*t*-Boc-Lysin sowie eines Phosphatpuffers erweiterte. Zeitgleich erlaubte der experimentelle Aufbau die Analyse von entsprechend abgeleiteten GO- und MGO-AGEs. Ein ähnliches heterogenes wässriges System wurde bereits in der Literatur als Modell für die Lipidperoxidation genutzt.¹¹⁸ Unter diesen Bedingungen verlief die Lipidperoxidation deutlich kontrollierter ab und im Zeitraum von 96 h kam es zu einer stetigen Zunahme der 1,2-Dicarbonylverbindungen (Tabelle 15). Nach 4 Tagen Inkubationszeit resultierten aus Leinöl wieder die höchsten Gehalte an GO ($\sim 0,16$ mg/kg), während MGO ($\sim 0,05$ mg/kg) in geringerem Maße gebildet wurde. Im Unterschied zu den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Inkubationen bei 150°C erreichte Sonnenblumenöl hingegen deutlich geringere Gehalte sowohl an GO ($\sim 0,02$ mg/kg) als auch an MGO ($\sim 0,01$ mg/kg). Eine mögliche Erklärung stellte hierbei der vergleichsweise hohe Anteil an α -Tocopherol (590 mg/kg Fett) in Sonnenblumenöl dar, welches dem radikalischen Kettenmechanismus der Lipidperoxidation unter diesen milderen Reaktionsbedingungen vermutlich effizient entgegenwirkte.⁴²⁰

Tabelle 15: Bildung von GO und MGO in wässrigen Emulsionssystemen in Gegenwart von *N*²-*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C.

Inkubationszeit [h]	GO und GO-AGEs			MGO und MGO-AGEs	
	GO	CML	GALA	MGO	CEL
	[μmol/mol Lysin]				
Leinöl					
48	3,75 ± 0,90	1,84 ± 0,27	0,12 ± 0,02	1,62 ± 0,20	0,37 ± 0,04
96	7,87 ± 2,79	4,46 ± 0,57	0,37 ± 0,05	2,03 ± 0,27	0,56 ± 0,12
Sonnenblumenöl					
48	0,77 ± 0,29	0,50 ± 0,09	0,050 ± 0,007	0,37 ± 0,10	0,21 ± 0,02
96	1,09 ± 0,54	0,93 ± 0,08	0,083 ± 0,007	0,46 ± 0,07	0,25 ± 0,03
Ribose					
48	n.b.	37795 ± 3213	435 ± 28	n.b.	2555 ± 96
96	n.b.	45722 ± 1003	630 ± 13	n.b.	3080 ± 77
Glucose					
48	n.b.	6792 ± 533	91 ± 4	n.b.	190 ± 17
96	n.b.	14665 ± 3993	187 ± 60	n.b.	786 ± 239
Maltose					
48	n.b.	3045 ± 147	20 ± 2	n.b.	4 ± 2
96	n.b.	4714 ± 605	41 ± 3	n.b.	12 ± 2

Die Gehalte der Lysin-AGEs von GO (CML, GALA) und MGO (CEL) korrelierten direkt mit der Bildung der freien Carbonyl-Strukturen und nahmen somit ebenfalls nahezu linear mit der Inkubationszeit zu. Für eine direkte quantitative Bewertung des Beitrags der Lipidperoxidation hinsichtlich dieser Aminosäure-Modifikationen wurden parallel äquimolare Stoffmengen von verschiedenen reduzierenden Zuckern inkubiert und GO- sowie MGO-AGEs analysiert. Es zeigte sich, dass der Hauptbildungsweg von CML, GALA und CEL durch die Fragmentierung von Kohlenhydraten verlief, während der Beitrag der Lipidperoxidation in diesem wässrigen Modellsystem marginal war. Verdeutlicht wurde dies beispielsweise in den vergleichenden wässrigen Inkubationen von Glucose und Leinöl, wobei letztere um Größenordnungen ($\sim 10^2$ - 10^4) geringere AGE-Gehalte aufwiesen (Tabelle 15). Innerhalb der Reihe an inkubierten Zuckern wurden aus Maltose zwar deutlich geringere Mengen an CEL gebildet, welche trotzdem die Ausbeuten von Leinöl um einen Faktor von 24 überstiegen. In einem dritten Experiment wurde das Backen von Waffeln aus Teigen mit unterschiedlicher Fettsäurezusammensetzung gewählt. Im Gegensatz zu der reinen Analyse eines fettreichen Lebensmittels wie Fleisch sollten die gewählten experimentellen Bedingungen eine klare analytische Auswertung der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Modulation der Fettsäurezusammensetzung und den Gehalten an freien Carbonyl-Strukturen sowie stabilen Proteinmodifikationen ermöglichen. Bei einem signifikanten Beitrag der Lipidperoxidation zur Bildung von GO und MGO unter diesen Modellbedingungen sollte der Anteil von ungesättigten Fettsäuren mit dem Gehalt an Carbonyl-Strukturen korrelieren. Die Analyse der 1,2-Dicarbonylverbindungen in den Waffeln erfolgte massenspektrometrisch (HPLC-MS/MS) nach wässriger Extraktion und Derivatisierung mittels *o*-Phenylendiamin.

Die Gehalte an GO (4-6 mg/kg) und MGO (2-4 mg/kg) zeigten gleichermaßen eine Zunahme mit der Backzeit. Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Oxidationsexperimenten von reinem Leinöl, Sonnenblumenöl und Kokosfett wiesen die entsprechend dotierten Waffeln hingegen innerhalb einer Zeitstufe annähernd gleiche Gehalte an GO und MGO auf (Abbildung 37). Offensichtlich müssen deren Bildungen in den Waffeln überwiegend durch die Maillard-katalysierten Fragmentierungen von Kohlenhydraten aus dem Mehl erklärt werden.⁵⁵ Hingegen kann ein bedeutender Beitrag der Lipidperoxidation unter diesen experimentellen Bedingungen ausgeschlossen werden. Für eine weitere Verifizierung dieser These wurden die Proteinfractionen der verschiedenen Waffeln isoliert und anschließend sowohl salzsauer als auch enzymatisch hydrolysiert. Dies ermöglichte die Quantifizierung eines breiten AGE-Portfolios, von dem eine Auswahl an GO- und MGO-Proteinmodifikationen in Abbildung 37 dargestellt wird.

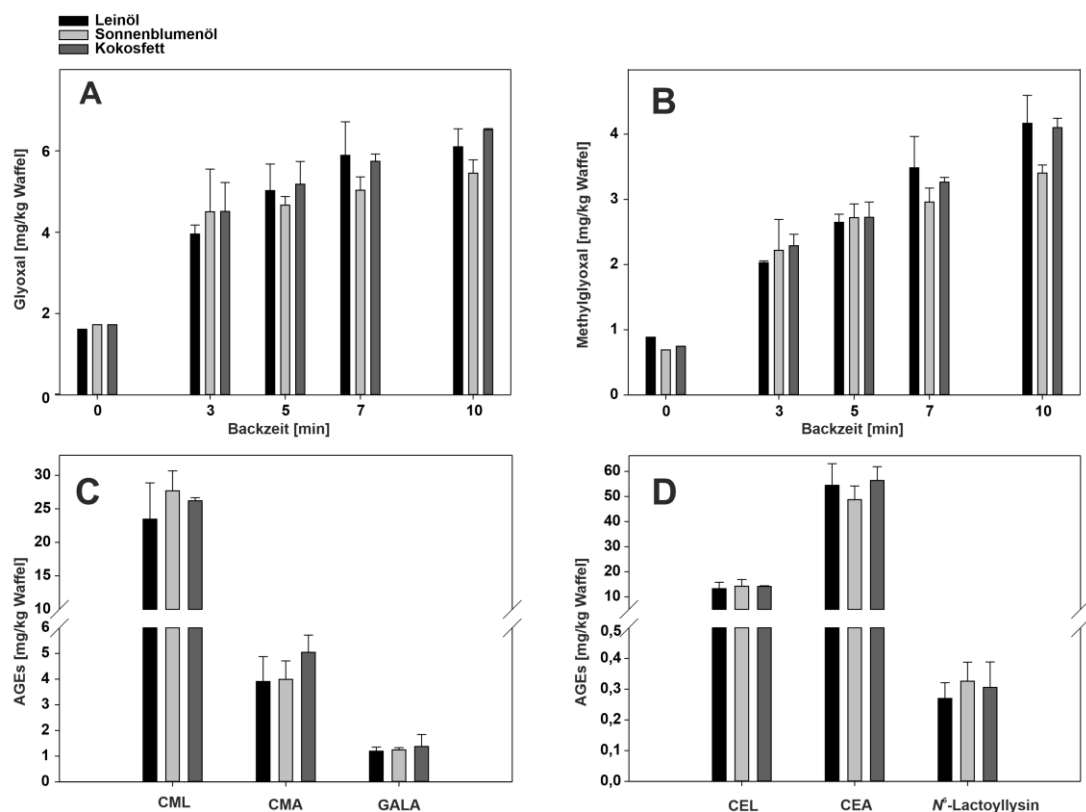


Abbildung 37: Zeitabhängige Veränderungen von GO (A) und MGO (B) während des Backens von Waffeln. Gehalte an GO-AGEs (C) und MGO-AGEs (D) in Waffeln, welche für 10 min für 150°C gebacken wurden.

Die Gehalte der GO-AGEs CML und GALA überstiegen hierbei die MGO-Pendants CEL und N⁶-Lactoyllysin und korrelierten somit direkt mit den freien Konzentrationen der entsprechenden 1,2-Dicarbonylen. Die Modulation der Fettsäurezusammensetzung der verschiedenen Teige führte jedoch auch nicht zu einer signifikanten Zunahme von GO- oder MGO-AGEs (Abbildung 37). Beispielsweise trug selbst die Lipidperoxidation von Leinöl, welches bis zu 54% Linolensäure beinhaltet, weder wesentlich zur Bildung von GO und MGO noch zu entsprechend abgeleiteten stabilen Proteinmodifikationen in den

kohlenhydratreichen Waffeln bei. Gleichzeitig verdeutlichten die völlig unterschiedlichen AGE-Muster in Fleisch- (Abbildung 29) sowie Waffelproteinen (Abbildung 37) die Herausforderungen zur Beschreibung der AGE-Gehalte von verschiedenen Lebensmitteln auf Grundlage von nur einzelnen AGE-Marker-Strukturen. Dennoch zeigten sich innerhalb einer Matrix mechanistische Gesetzmäßigkeiten, welche grundsätzlich auch durch vereinfachte Modellinkubationen abgebildet werden können. Beispielsweise zeigten Backwaren, welche keine Fermentation durchliefen, nahezu identische relative Verhältnisse von GO- und MGO-AGEs im Vergleich zu den Waffeln.⁵⁵ Zusammengefasst wurden in thermischen Oxidationssystemen von Ölen wie Sonnenblumenöl oder Leinöl die 1,2-Dicarbonylverbindungen GO und MGO nur in sehr geringen Mengen gebildet. In Gegenwart von reduzierenden Zuckern war der Beitrag der Lipidperoxidation zur Bildung dieser 1,2-Dicarbonyle unter den gewählten experimentellen Bedingungen vernachlässigbar.

4.2.2 Bildung von MDA-Proteinmodifikationen in Lebensmitteln

Wie in Kapitel 2.1.4 vorgestellt wurde, führten die Fragmentierungen von ungesättigten Fettsäuren zu einer Reihe an kurzkettigen Aldehyden, welche in ihrer freien Form bereits in Lebensmitteln nachgewiesen wurden. Über die Bedeutung von abgeleiteten Proteinmodifikationen (Kapitel 2.4) in Lebensmitteln ist jedoch wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit setzte ihren Fokus auf den Nachweis des freien sowie proteingebundenen MDAs, welches als ein bedeutendes Produkt der Lipidperoxidation verstanden wird (Kapitel 2.1.2.6). Die spezifische Analytik von MDA erfolgte nach wässriger Extraktion und 2-TBA-Derivatisierung mittels HPLC-FLD. Beispielsweise wurde die quantitative Bedeutung von MDA in den Inkubationen der reinen Öle bei 150°C verdeutlicht (Abbildung 38). Entsprechend der Erwartung zeigte Leinöl die höchsten Ausbeuten an MDA, welche zum einen durch die höhere Oxidationsneigung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren erklärt werden kann (Kapitel 2.1.2). Zum anderen wird MDA bevorzugt aus ungesättigten Fettsäuren gebildet, welche drei und mehr Doppelbindungen beinhalten (Kapitel 2.1.2.6).¹³¹ Wie auch bereits für die Bildungen von GO und MGO beschrieben wurde, erreichte auch MDA nach 40 min ein Maximum, wobei aus den Inkubationen von Leinöl (75 mg/kg) deutlich höhere Gehalte im Vergleich zu Sonnenblumenöl (10 mg/kg) hervorgingen. Nachfolgend kam es bei Leinöl zu einer Abnahme von MDA, während Sonnenblumenöl gleichbleibende Konzentrationen zeigte. Kokosfett war hingegen in allen Modellsystemen inert gegenüber der Bildung von MDA. In Leinöl-Inkubationen (150°C) überstiegen die Ausbeuten von MDA somit aus quantitativer Sicht die von GO und MGO um Faktoren von 30 bzw. 100.

Prinzipiell wurden diese Ergebnisse auch für die wässrigen Inkubationen in Gegenwart von Lysin bei 50°C bestätigt. So ging aus der Inkubation von Leinöl wieder die höchsten Gehalte an MDA hervor (Abbildung 38), welche auch direkt mit der Zunahme von MDA-Lys korrelierten (Tabelle 16). Die Konzentrationen von MDA blieben hingegen bei den

Reaktionen von Sonnenblumenöl innerhalb der ersten 48 h Inkubationszeit konstant und erreichten nach 96 h ca. 10-17-fach geringere Gehalte an MDA und MDA-Lys. Die Gehalte des freien MDAs überstiegen in Leinöl-Inkubationen nach 96 h die Konzentrationen von GO und MGO um Faktoren von 10 bzw. 40. Dies ging auch mit dem deutlich höheren Anteil an Lysin-gebundenem MDA einher, welches durch das Verhältnis von MDA-Lys zu CML und CEL von 40:1 bzw. 333:1 beschrieben wurde.

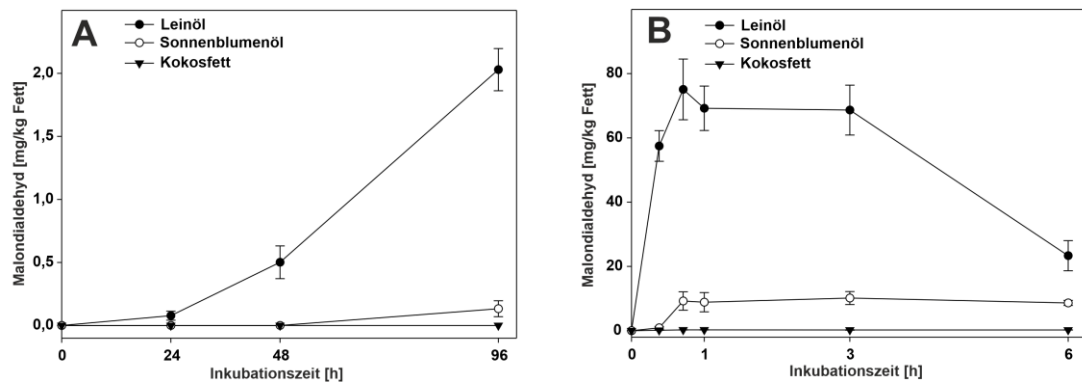


Abbildung 38: Veränderungen der MDA-Gehalte in den Inkubationen von Leinöl, Sonnenblumenöl und Kokosfett. Emulsionssystem in Gegenwart von N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C (A) sowie Inkubation der reinen Öle bei 150°C (B).

Tabelle 16: Bildung von MDA-Lys in wässrigen Emulsionssystemen in Gegenwart von N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C.

Zeit (h)	Leinöl	Sonnenblumenöl	Kokosfett
	[μmol MDA-Lys/mol Lysin]		
0	< LOD	< LOD	< LOD
24	11,8 ± 1,3	< LOD	< LOD
48	43,2 ± 9,5	6,7 ± 0,5	< LOD
96	187,3 ± 41,4	19,7 ± 8,6	< LOD

In der Backreihe der Waffeln konnten für alle verwendeten Teige zunächst nach 3 min eine Abnahme von MDA auf ca. 50% der Ausgangskonzentration gemessen werden. Mit fortschreitender Backzeit kam es lediglich bei Waffeln, welche mit Leinöl dotiert wurden, zu einer signifikanten Bildung von MDA, sodass nach 10 min ca. 90% der Ausgangskonzentration erreicht wurden (Abbildung 39). Waffeln mit einem Zusatz von Sonnenblumenöl oder Kokosfett zeigten hingegen nur eine geringe Steigerung des Gehalts von freiem MDA mit einer längeren Backzeit, verblieben jedoch deutlich unterhalb der Ausgangskonzentration. Die Abnahme von freien Carbonyl-Strukturen während der thermischen Prozessierung könnte auf die Kondensationsreaktionen mit nucleophilen Aminosäuren zurückgeführt werden.¹⁷⁸ Ein erster indirekter Hinweis für die quantitative Bedeutung des proteingebundenen MDAs in den Waffeln ergab sich in der vorliegenden Arbeit durch die fünf bis achtfache Zunahme der Konzentrationen von MDA, wenn die Waffeln zuvor mittels Natriumhydroxid hydrolysiert wurden (Abbildung 39). Diese Methode

find bereits vielfach Anwendung zur indirekten Bestimmung des proteingebundenen Anteils von MDA in Plasma (Tabelle 5), jedoch wurden die so hydrolysierten MDA-Proteinmodifikationen bisher nicht gezielt strukturell untersucht. Tatsächlich enthüllte die alkalische Hydrolyse von Waffeln mit einem Zusatz von Leinöl den linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration an MDA und der Backzeit. Auch wenn MDA aus der Lebensmittelmatrix nicht zweifelsfrei quantitativ freigesetzt wurde,¹⁶⁴ verdeutlichte der hohe Anteil an gebundenem MDA im rohen Teig dessen Reaktivität gegenüber Makromolekülen. Die strukturellen Charakterisierungen von MDA-Proteinmodifikationen im Teig sowie in den verschiedenen Waffeln waren Gegenstand von nachfolgenden Experimenten.

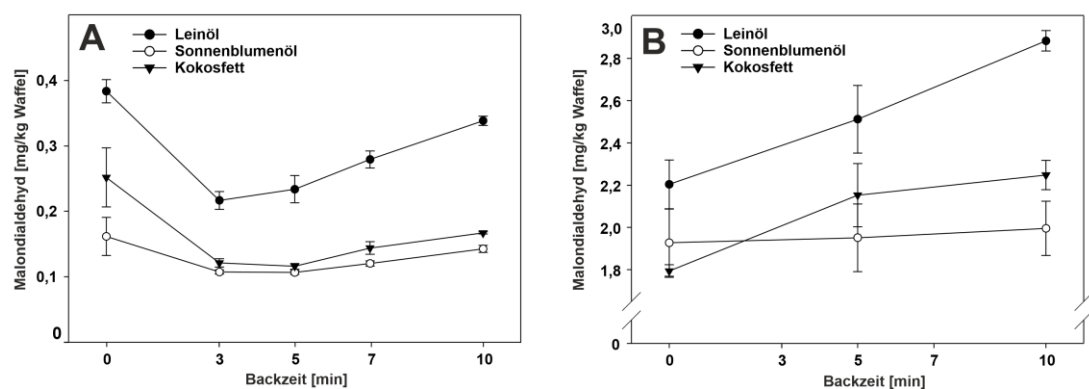


Abbildung 39: Analyse von MDA in wässrigen Extrakten von Waffeln, welche mit unterschiedlichen Ölen dotiert wurden, nach Derivatisierung mittels 2-TBA. Zeitabhängige Konzentrationsänderungen von MDA in nativen Waffelextrakten (A) und alkalisch hydrolysierten Waffeln (B).

In Vorversuchen wurden N^2 -*t*-Boc-Lysin sowie N^2 -*t*-Boc-Arginin zunächst mit MDA inkubiert. Das Produktspektrum wurde vor und nach der alkalischen Hydrolyse mittels HPLC-Analytik verglichen sowie einzelne modifizierte Aminosäuren massenspektrometrisch charakterisiert. Dies gab einen ersten Hinweis darauf, dass vermutlich MDA-Lys und MDA-Lys₂ Hydrolyse empfindliche Strukturen darstellen und für die Freisetzung von MDA unter diesen Bedingungen verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Arginin-Modifikation NPO die beiden Lysin-Modifikationen MDA-Lys und MDA-Lys₂ als authentische Referenzstrukturen synthetisiert und dienten als Markersubstanzen für proteingebundenes MDA. Dies stellte die Grundlage für die nachfolgende Entwicklung eines Aufarbeitungsprotokolls und der chromatographischen sowie massenspektrometrischen Methoden dar. In einem ersten Teil wurde die Stabilität unter den Bedingungen der alkalischen Proteinhydrolyse evaluiert. Während unter diesen Bedingungen die authentischen Referenzstrukturen MDA-Lys und MDA-Lys₂ quantitativ hydrolysiert wurden, blieb NPO nahezu stabil. Im Hinblick auf die freigesetzte Menge von MDA unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse könnte so ein Großteil von MDA in Waffeln gebunden an Lysin-Resten vorliegen. Bisher erfolgte die Quantifizierung von MDA-Lys, MDA-Lys₂ und NPO in der Literatur nach einer salzsauren Proteinhydrolyse (6 M HCl, 110°C, 20 h), wobei die Lysin-

Addukte zusätzlich durch vorherige Reduktion mittels NaBH₄ in die stabilen Amin-Derivate überführt werden mussten. Ein Nachteil dieser Methode besteht in der Instabilität von NPO unter den salzsauren Bedingungen, während die quantitative Reduktion der Lysin-Addukte durch den vinylogenen Carboxyl-Charakter von MDA-Lys und MDA-Lys₂ deutlich erschwert ist.^{272,285} Um beide Nachteile gleichermaßen zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit der direkte Nachweis der MDA-Addukte nach einer enzymatischen Hydrolyse der Waffelproteine etabliert. Tatsächlich ermöglichte dies den parallelen Nachweis sowie die Quantifizierung von NPO, MDA-Lys und MDA-Lys₂ in den Waffelproben, wobei die Bedeutung von MDA-Lys₂ gesondert im Kontext von Proteinquervernetzungen in Kapitel 4.3.2 behandelt wird. Die Relevanz einzelner MDA-Proteinmodifikationen in Lebensmitteln war bisher unbekannt. Im Allgemeinen bestätigte die Quantifizierung der MDA-Proteinmodifikationen die Ergebnisse des freien MDAs in den Waffeln. So führte der Zusatz von Leinöl in den Waffeln auch zu den höchsten Konzentrationen von MDA-Lys (Tabelle 17), welches nach 10 min Backzeit etwa 23,5 mg/kg erreichte und somit zu einem bedeutenden Teil Lysin-Reste modifizierte. Im Gegensatz hierzu zeigten Waffeln, welche mit Sonnenblumenöl und Kokosfett dotiert wurden, um Faktoren von 21-47 geringere Mengen an MDA-Lys. Der Großteil der Zunahme von MDA nach einer alkalischen Hydrolyse könnte so durch MDA-Lys erklärt werden, welches in matrixfreien Modell-Systemen unter den gewählten Hydrolyse-Bedingungen quantitativ MDA freisetzt. Im Gegensatz hierzu spielte die Modifikation von Arginin durch MDA unter Bildung von NPO in Waffeln (n.w.-0,78 mg/kg) aus quantitativer Sicht nur eine untergeordnete Rolle. Hingegen reagierten 1,2-Dicarbonyle bevorzugt mit Arginin. Beispielsweise zeigte CEA und MGH1/MGH3 etwa achtfach höhere Konzentrationen als CEL (Abbildung 37). Dies unterstreicht die unterschiedlichen Reaktivitäten von 1,2-Dicarbonylen und MDA gegenüber Arginin. Die geringe Bedeutung von NPO wurde in der vorliegenden Arbeit auch am Beispiel der enzymatisch hydrolysierten Fleischproteine (Kapitel 4.1) bestätigt. So wurden nach 8 min Bratzeit Gehalte von $1,58 \pm 0,35$ mg/kg gebildet, welche deutlich unterhalb von CML (9 mg/kg) und CEL (40 mg/kg) lagen.

Tabelle 17: Bildung von MDA-Proteinmodifikationen beim Backen von Leinöl-Waffeln

	Teigzusatz [mg AGE/kg Waffel]/ Backzeit [min]						
	LS ¹ /0 min	LS ¹ /5 min	SB ² /5 min	KO ³ /5 min	LS ¹ /10 min	SB ² /10 min	KO ³ /10 min
MDA-Lys	7,8 ± 2,4	15,0 ± 5,1	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,1	23,5 ± 7,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1
MDA-Arginin	0,09 ± 0,05	0,23 ± 0,11	< LOD	< LOD	0,73 ± 0,14	< LOD	< LOD

¹Zusatz von Leinöl, ²Zusatz von Sonnenblumenöl, ³Zusatz von Kokosfett

Die bisher in der Literatur beschriebenen stabilen ALEs, welche aus den Reaktionen von Lysin mit Carbonyl-Strukturen wie Alkanalen, 2-Alkanalen, 2-Hydroxyalkanalen und 4-Hydroxy-2-alkanalen hervorgehen, können überwiegend in die Strukturklassen der Pyridin-, Furan-,

Pyrrol- sowie Amid-Strukturen klassifiziert werden (Kapitel 2.4). Ausgehend von dem aktuellen Stand der Literatur sind hingegen Modifikationen von Arginin durch Sekundärprodukte der Lipidperoxidation in Lebensmitteln quantitativ nicht von Bedeutung. Dies deckte sich beispielsweise auch mit Modellreaktionen von 4-HNE, MDA oder Acrolein bei denen die Guanidin-Funktion von Arginin inert war oder nur eine geringe Reaktivität zeigte.^{178,256,297,347,351} Somit kann vermutlich der größte Teil der Arginin-Modifikationen in lipid- sowie kohlenhydratreichen Lebensmitteln tatsächlich auf die Reaktionen mit 1,2-Dicarbonylverbindungen zurückgeführt werden. Hingegen treten letztere mit Carbonyl-Strukturen, welche aus der Lipidperoxidation hervorgehen, in Konkurrenzreaktion um die Modifikation von Lysin. Erste indirekte Hinweise für die Bedeutung der Reaktionen von sekundären Produkten der Lipidperoxidation mit Lysin ergaben sich aus Modellinkubationen, bei denen prozessbegleitend indirekt der Modifikationsgrad durch die Quantifizierung von nativem Lysin abgeschätzt wurde. Die entsprechende Abnahme von Lysin wurde auf verschiedenste Modifikationen zurückgeführt, welche allgemein jedoch nicht charakterisiert wurden. Beispielsweise war diese in den vergleichenden Inkubationen von Casein mit Linolensäure (65%) und Arachidonsäure (83%) höher als bei einer äquimolaren Menge Glucose (54%).¹²⁰ Daneben konnten nur etwa 10% der Modifikationen von Lysin während des Röstens von Erdnüssen auf die Bildungen von CML, Pyrralin und *N*⁶-Fructosyllysin zurückgeführt werden.⁴²¹ In gerösteten Erdnüssen wurden in nachfolgenden Arbeiten erstmalig MP-Lysin sowie 2-PPL quantifiziert, wobei beide Strukturen gleichermaßen nur zu einem kleinen Teil die Modifikationen von Lysin erklären konnten.^{178,347} Zusammengefasst ist die Bedeutung der nicht-enzymatischen Proteinmodifikation durch Sekundär- und Tertiärprodukte der Lipidperoxidation in Lebensmitteln zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur zu einem kleinen Teil verstanden. Ausgehend von Modellsystemen ist ein breites Portfolio an ALEs aufgeklärt sowie deren grundlegenden Bildungsmechanismen verstanden (Kapitel 2.4). Auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass die Produktvielfalt in heterogenen Systemen weiter aufgefüllt wird. Beispielsweise wurde in einer Modellinkubation ein Pyrrol-Derivat nachgewiesen, welches aus der kombinierten Reaktion von Ethylamin mit 4-HNE und Acrolein hervorging.²⁹⁸ In der vorliegenden Arbeit wurden NPO, MDA-Lys und MDA-Lys₂ erstmalig massenspektrometrisch in Lebensmitteln quantifiziert, wobei MDA-Lys eine bedeutende Leitstruktur für MDA-Proteinmodifikationen darstellte. Bereits der Zusatz von 5% Leinöl führte in den kohlenhydratreichen Waffeln zu einem signifikanten Beitrag von MDA zur Proteinmodifikation. Für ein weitergehendes Verständnis müssen nun weitere Strukturen in das Analyseportfolio einfließen und gezielt verschiedene fettreiche Lebensmittel untersucht werden.

4.3 Proteinquervernetzung durch die Prozessierung von Lebensmitteln

4.3.1 Amidine sind neuartige Advanced Glycation End Products

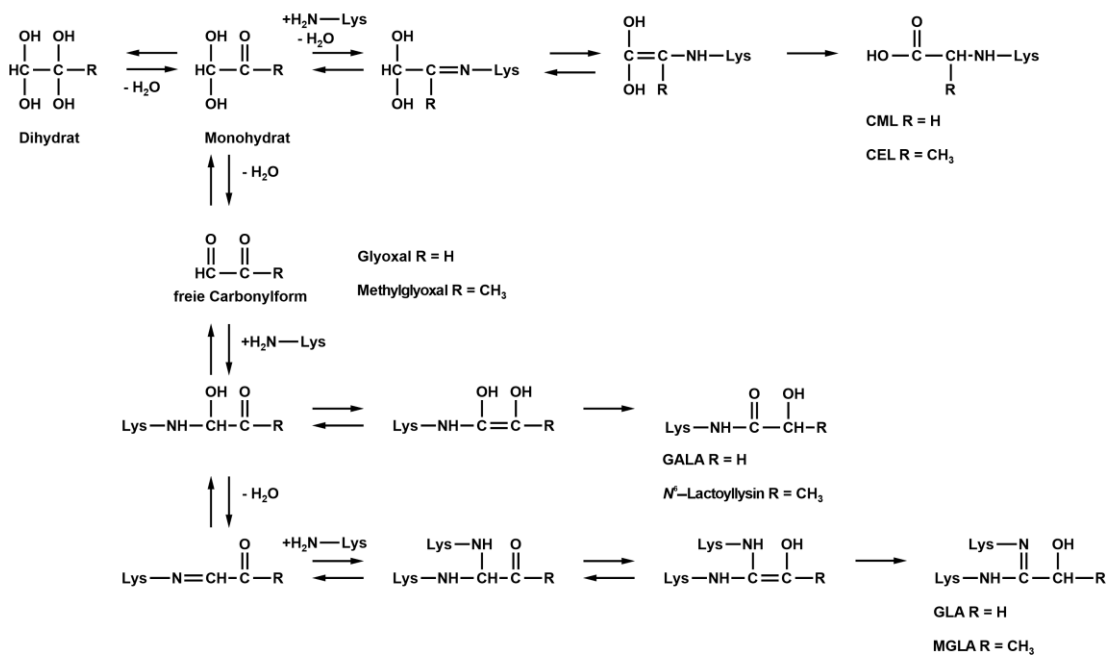


Abbildung 40: Bildung von AGEs durch Reaktion von GO und MGO mit Lysin.

1,2-Dicarbonyle stellen wichtige Präkursoren für die Bildungen von *crosslink*-AGEs dar. Die grundlegenden Reaktionen mit Proteinen wurden bereits in Kapitel 2.3.3 diskutiert und in Abbildung 14 vereinfacht graphisch dargestellt. In wässrigen Systemen liegen 1,2-Dicarbonyle überwiegend in der hydratisierten Form vor, welche in einem Gleichgewicht mit der reaktiven und freien Carbonylgruppe steht. In dem vorliegenden Kapitel wird der Isomerisierungsmechanismus nochmals unter besonderer Berücksichtigung der hydratisierten 1,2-Dicarbonylverbindungen dargestellt. Die Reaktion des GO-Monohydrats mit Lysin führt zunächst zu einem GO-Imin-Monohydrat, welches sich durch die nachfolgende Isomerisierung unter Bildung von CML stabilisieren kann (Abbildung 40). Im Grunde stellt dieser Mechanismus eine intramolekulare Redox-Reaktion dar, die in ihrem Ergebnis einer Cannizzaro-Reaktion gleicht.¹² Zusätzlich erklärt diese durch die Leitstruktur namentlich geprägte CML-Isomerisierungskaskade die Bildung von drei weiteren AGEs, welche jedoch im Gegensatz zu CML alle das Vorliegen der freien 1,2-Dicarbonyl-Struktur von GO erfordern. Innerhalb dieser Isomerisierungskaskade wurde die Bildung von Amidin-AGEs 2001 durch die weitere Addition von Lysin an die Imin-Funktion des GO-Imins postuliert. Die gebildete Aminal-Struktur könnte dann zu GLA isomerisieren.¹² Tatsächlich beschrieb Gupta et al. bereits die Modifikation der Fructose-1,6-disphosphat-Aldolase durch eine Amidin-*crosslink*-Struktur, welche mit einem Funktionsverlust des Enzyms in Verbindung gebracht wurde.⁴²² Grundsätzlich konnte der formulierte Reaktionsmechanismus auch bereits vollständig auf die von MGO abgeleiteten strukturellen Pendants CEL, N⁶-Lactoyllysine,

MOLA und MOLD übertragen werden und sollte somit für die Reaktionen von Lysin mit 1,2-Dicarbonylen allgemein gültig sein.⁴²³ In der vorliegenden Arbeit wurde zeitgleich die Bedeutung der potentiell gebildeten Amidin-Struktur MGLA untersucht, welche aus MGO und Lysin hervorgehen sollte. Die reaktionsmechanistischen Hintergründe der Bildung der Amidin-AGEs wurden jedoch zunächst auf Grundlage der Reaktionen von GO mit Lysin untersucht.

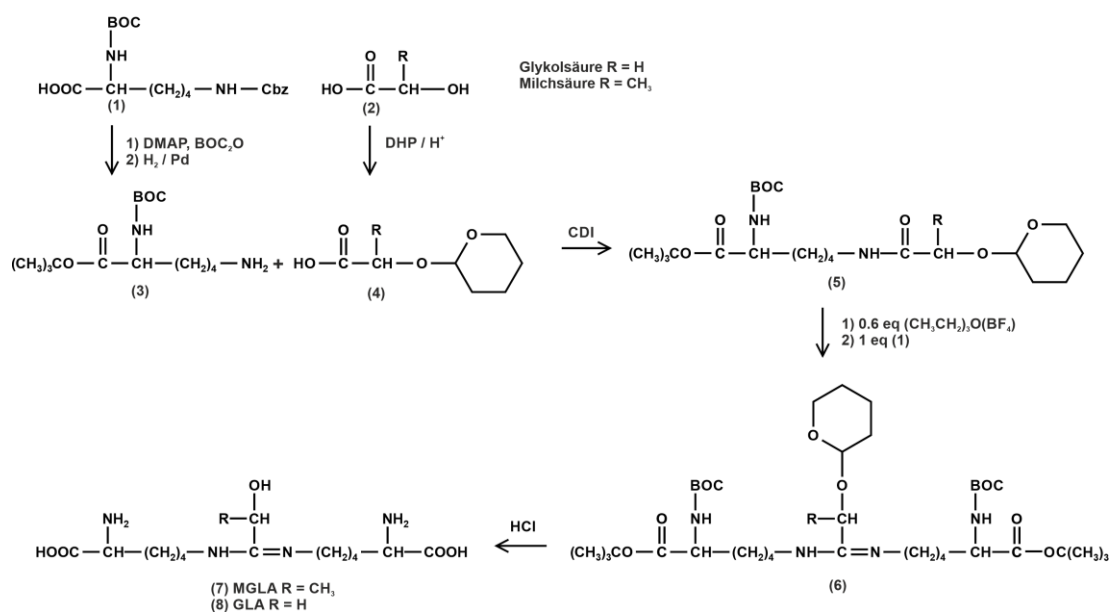


Abbildung 41: Synthesestrategie der Amidin-AGEs GLA und MGLA.

Für weitergehende Untersuchungen waren die Synthesen der authentischen Referenzstrukturen GLA und MGLA nötig, welche ausgehend von *N*²-*tert*-Butoxycarbonyl-*N*⁶-Benzyloxy-Lysin (*N*²-*t*-Boc-*N*⁶-Cbz-Lysin) (1) und der entsprechenden Säurekomponente (Glykolsäure oder Milchsäure) (2) in jeweils einer fünfstufigen Synthesestrategie erfolgreich war (Abbildung 41). Zunächst wurde *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-Cbz-Lysin (1) durch 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), Di-*tert*-butyldicarbonat und *tert*-Butanol in den entsprechenden *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-Cbz-Lysin-*tert*-Butylester überführt. Anschließend wurde die Cbz-Schutzgruppe hydrolytisch unter Freisetzung von *N*²-*t*-Boc-Lysin-*tert*-butylester (3) abgespalten. Die entsprechenden Carbonsäuren (2) wurden zunächst mit 3,4-Dihydropyran (DHP) umgesetzt, wobei die Alkoholgruppen in Form der entsprechenden Acetale (4) vor unkontrollierten Nebenreaktionen geschützt wurden. Anschließend wurden diese mit (3) unter Katalyse von Carbonyldiimidazol (CDI) umgesetzt. Die so erhaltenen Amid-Strukturen (5) wurden mittels Triethyloxoniumtetrafluoroborat *in situ* O-alkyliert und die intermediär gebildeten Imidat-Salze mit einem weiteren äquivalent (3) versetzt. Die schließlich gebildeten Amidin-Strukturen (6) führten nach säurekatalytischer Abspaltung der Schutzgruppen sowie mehrstufiger Aufreinigung zu den authentischen Referenzstrukturen GLA (7) und MGLA (8), deren Identität spektroskopisch bestätigt werden konnte.^{9,373}

Der erstmalige Nachweis von GLA erfolgte in Inkubationen bei 37°C, welche in Phosphatpuffer (pH 7,4) mit äquimolaren Konzentrationen von GO und *N*²-*t*-Boc-Lysin durchgeführt wurden. Diese Inkubationsbedingungen wurden bereits vielfach für reaktionsmechanistische Untersuchungen der Maillard-Reaktion genutzt.^{10–12,35} Hierbei kam es zu einer linearen Zunahme von GLA mit der Reaktionszeit (Tabelle 18). Die massenspektrometrische Quantifizierung von GLA erforderte hierfür eine chromatographische Trennung zu GOLA, welche in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung einer RP-HPLC in Kombination mit Heptafluorbuttersäure (HFBA) als Ionenpaarreagenz gelang. Im direkten Vergleich zu GOLA waren die Konzentrationen von GLA nach 7 Tagen Inkubationszeit etwa um einen Faktor von 23 geringer. Die Bildung von monovalenten AGEs war hingegen gegenüber den respektiven *crosslink*-AGEs deutlich favorisiert und spiegelte sich in dem Verhältnis von CML/GOLA (90:1) und GALA/GLA (108:1) wider. Parallel durchgeführte aerobe und anaerobe Inkubationen von GO mit *N*²-*t*-Boc-Lysin zeigten annähernd gleiche Ausbeuten an GLA und bestätigte den nicht-oxidativen Bildungsmechanismus von GLA. Dies galt gleichermaßen für CML, GALA, GOLA und GOLD, deren Bildungen ebenfalls durch die nicht-oxidative CML-Isomerisierungskaskade formuliert wurden (Tabelle 18).

Allgemein waren die Bildungen der AGEs stark vom pH-Wert der Inkubationslösung abhängig, wobei dies auf die Abhängigkeit der Reaktivität der *N*⁶-Aminogruppe von Lysin von dem pH-Wert des Mediums zurückgeführt werden konnte. Dies wird allgemein über den *p*_{K_s}-Wert (~10,3) der *N*⁶-Aminogruppe von Lysin beschrieben, welche bei pH-Werten kleiner des *p*_{K_s}-Wertes zu einem überwiegenden Anteil in der protonierten und somit unreaktiven Form vorliegen. Erwartungsgemäß korrelierte die Erhöhung des pH-Wertes von 7,4 auf 10 direkt mit einer um Faktor 2,7 bzw. 4 gesteigerten Bildung von CML und GLA. Hingegen waren bei pH 4,5 nur geringe Mengen von CML quantifizierbar und GLA nicht nachweisbar.

Ein alternativer Bildungsweg von GLA könnte sich durch die Reaktion von Lysin mit GA ergeben. In Modellsystemen konnte GA unter Beteiligung von Sauerstoff und Aminen leicht zu GO oxidiert werden und somit GO-AGEs ausbilden.³⁵ Neben dem Bildungsweg über GO wurde speziell für CML auch ein alternativer Reaktionsmechanismus ausgehend von GA und Lysin formuliert, welcher über ein 1,4-Dialkyl-1,4-dihydropyrazin-Intermediat verlaufen soll.³⁵ Obwohl sich die Bildungskinetiken von CML in den vergleichenden Inkubationen von GA und GO deutlich unterschieden, führten beiden Carbonyl-Strukturen nach 7 Tagen Inkubationszeit im Ergebnis jedoch zu vergleichbaren Mengen von CML.³⁵ In der vorliegenden Arbeit erreichte die Konzentration von GLA hingegen in der aeroben Inkubation von GA nach 7 Tagen im direkten Vergleich zu einer parallel durchgeführten GO-Inkubation nur etwa 16% (~1,5 µmol/mol Lysin), während die Bildung unter anaeroben Bedingungen komplett inhibiert wurde. Die Bildung von GLA aus GA erfordert vermutlich zunächst eine

vorhergehende Oxidation zu GO, während ein alternativer Bildungsmechanismus im Hinblick auf die geringen Ausbeuten ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 18: Bildung von AGEs in den Inkubationen von 40 mM *N*²-*t*-Boc-Lysin mit 40 mM GO in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C.

Inkubationszeit [h]	CML	GALA	GOLD	GOLA	GLA
		[mmol/mol Lysin]		[μmol/mol Lysin]	
pH 7,4, aerob					
24	3,6	0,1	0,7	80,9	1,4
72	8,6	0,4	1,0	132,9	4,6
120	13,6	0,7	1,2	148,6	7,5
168	18,0	1,0	1,4	202,3	9,1
pH 7,4, anaerob					
168	17,0	0,9	1,5	202,5	8,5
pH 4,5, aerob					
168	0,5	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
pH 10, aerob					
168	48,2	6,8	2,2	326,4	35,7

GLA konnte in verschiedenen Modellreaktionen von reduzierenden Zuckern, welche mit *N*²-*t*-Boc-Lysin unter physiologischen Bedingungen (pH 7,4, 37°C) für 21 Tage inkubiert wurden, quantifiziert werden. Die Ausbeuten folgten den bereits diskutierten Reaktivitätsunterschieden von Pentosen, Hexosen sowie Disacchariden. Die Inkubationen von Ribose zeigten folglich die höchsten Konzentrationen von GLA und CML, während die Ausbeuten in Systemen mit Glucose oder den entsprechenden Disacchariden um Faktoren von 7-8 bzw. 17-46 geringer waren (Tabelle 19). Im direkten Vergleich zu den bereits diskutierten Ergebnissen der GO-Inkubationen, wurde CML in den Zuckerinkubationen in nochmals deutlich höheren Ausbeuten gebildet. Dies führte zu einem noch größeren Konzentrationsunterschied zwischen CML und GLA. Beispielsweise wurden in Ribose-Inkubationen gegenüber der reinen GO-Inkubationen um Faktor 7 mehr CML als GLA gebildet. Dies kann durch den zusätzlichen Bildungsweg von CML über die oxidative Fragmentierung des Amadori-Produkts erklärt werden und wurde bereits durch die direkte Inkubation des Amadori-Produkts bestätigt.¹⁸⁹ Dieser von GO unabhängige Bildungsweg konnte jedoch für GLA aufgrund der geringen Ausbeuten (~0,1 μmol/mol Lysin) ausgeschlossen werden. Die Bildung von GLA in den Inkubationen des Amadori-Produkts müssen hingegen auf GO zurückgeführt werden, welches unter diesen Reaktionsbedingungen aus der Fragmentierung des Amadori-Produkts hervorging. Zusammengefasst konnte ausgehend von verschiedenen Modelluntersuchungen die Bildung von GLA mechanistisch alleinig durch die Reaktion von GO mit Lysin durch einen nicht-oxidativen Isomerisierungsmechanismus bestätigt werden.

Tabelle 19: Bildung von CML und GLA in den Inkubationen von 100 mM Zucker mit 40 mM N^2 -*t*-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C nach 21 Tagen.

		Amadori-Produkt ¹	Ribose	Glucose	Maltose	Lactose
CML	[mmol/mol Lysin]	51,3 ± 1,8	46,5 ± 0,3	6,6 ± 0,4	2,6 ± 0,3	1,0 ± 0,6
GLA	[μmol/mol Lysin]	0,09 ± 0,03	3,31 ± 0,27	0,41 ± 0,03	0,19 ± 0,11	0,12 ± 0,06

¹ Glucose-Lysin

Die Stabilität der Amidin-Bindung gegenüber säurekatalysierter Hydrolyse wird maßgeblich von der Substitution der Stickstoffatome beeinflusst, wobei beispielsweise eine N,N' -dialkylierte-Polyamidin-Struktur im sauren Medium (pH 1) stabil war.^{424,425} Tatsächlich war auch die Amidin-Bindung von GLA unter den Bedingungen der sauren Proteinhydrolyse stabil (Tabelle 20).¹² Der parallele Nachweis von GLA nach enzymatischer Hydrolyse schloss hierbei gleichzeitig eine reine Artefakt-Bildung des Amidin-AGEs unter den Bedingungen der salzsauren Proteinhydrolyse aus. Klassischerweise werden Proteine vor einer sauren Hydrolyse mittels NaBH_4 reduziert, um eine Artefakt-Bildung des wichtigen AGE-Markers CML aus Amadori-Produkten zu verhindern (Kapitel 2.3.1.4).^{189,426} Im Hinblick auf die Verluste von Amidin-Strukturen durch eine entsprechende Reduktion (Tabelle 20), welche auf die Bildungen der substituierten Amine zurückgeführt wurden, erfolgte die Quantifizierung von GLA und MGLA nach salzsaurer Proteinhydrolyse ohne vorherige Reduktion.^{427,428}

Tabelle 20: Stabilität von GO-AGEs unter den Bedingungen einer salzsauren Proteinhydrolyse (6 M HCl, 110°C, 20 h).

	CML	GALA	GOLD	GOLA	GLA
	Wiederfindung [%]				
Ohne Reduktion	101 ± 4	< LOD	100 ± 2	< LOD	96 ± 3
Mit Reduktion ¹	96 ± 5	< LOD	102 ± 3	< LOD	40 ± 4

¹ 0,125 g NaBH_4 /g Protein, 1 h, 20°C

Der erstmalige Nachweis von proteingebundenem GLA erfolgte in einer Reihe von Modellproteinen, welche zuvor mittels GO inkubiert wurden. Im direkten Vergleich zu den bereits beschriebenen Reaktionen des Aminosäure-Derivats N^2 -*t*-Boc-Lysin mit GO begünstigte die Proteinmatrix in den Modellsystemen die Bildung von *crosslink*-AGEs und tatsächlich war das relative Verhältnis der AGEs maßgeblich von den verwendeten Proteinen abhängig (Tabelle 21). Im Gegensatz zu den einfachen 2:1 Reaktionen von N^2 -*t*-Boc-Lysin mit GO ist die Ausbildung von intra- und intermolekularen Protein-*crosslinks* deutlich komplexer. Auf der einen Seite ist der Abstand zwischen zwei Reaktionspartnern und somit die sterischen Anforderungen der elektrophilen Zentren für die Reaktionen mit Nucleophilen entscheidend. Auf der anderen Seite werden beispielsweise die Reaktivitäten einzelner Lysin-Reste auch durch Nachbargruppen-Effekte moduliert, welche sich entweder direkt aus der Aminosäuresequenz oder aus der komplexen dreidimensionalen räumlichen Proteinstruktur ableiten. Neben der Beeinflussung des pK_s -Wertes von Lysin konnte am Beispiel des Amadori-

Produkts gezeigt werden, dass auch Isomerisierungsreaktionen durch benachbarte Aminosäuren katalysiert werden können.^{429,430} Dies erklärt auch das allgemeine Phänomen der Protein „Hot-Spots“, welche Aminosäure-Reste bezeichnen, die bevorzugte Orte der Glykierung darstellen.⁴³¹ Diese verschiedenen Effekte müssen sowohl die unterschiedlichen Absolutwerte als auch relativen Verhältnisse der einzelnen AGEs zueinander erklären. Im direkten Vergleich zu den Ergebnissen der Inkubationen von *N*²-t-Boc-Lysin mit GO waren die Unterschiede jedoch deutlich geringer ausgeprägt. Beispielsweise lag GLA in den Proteininkubationen um Faktoren von 7-26 unterhalb von GOLD (Tabelle 21), während in den Inkubationen von *N*²-t-Boc-Lysin mit GO die Gehalte von GOLD gegenüber GLA um Faktoren von 150-530 größer waren (Tabelle 18).

Tabelle 21: Inkubationen von Proteinen (6 mg/mL) mit 40 mM GO in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C für 7 Tage.

Protein	CML	GALA	GOLA	[mmol/mol Lysin]	
				GLA	GOLD
BSA	130 ± 20	10 ± 2	2,4 ± 0,4	0,26 ± 0,04	6,9 ± 0,6
Casein	150 ± 10	n.b.	n.b.	0,22 ± 0,01	2,5 ± 1,1
α -Lactalbumin	180 ± 20	n.b.	n.b.	0,71 ± 0,02	4,8 ± 0,2
β -Lactoglobulin	220 ± 10	n.b.	n.b.	1,06 ± 0,07	7,2 ± 1,5

Grundsätzlich sind intramolekulare Quervernetzungen durch Disulfidbrücken für die Faltung und Stabilität von Proteinen essentiell. Eine korrekt ausgebildete Tertiärstruktur ist auch Voraussetzung für die Entfaltung der charakteristischen funktionellen Eigenschaften von Proteinen. Gleichmaßen stabilisieren intermolekulare Quervernetzungen die Organisation von komplexeren Proteinaggregaten. In Lebensmitteln haben Proteinquervernetzungen einen direkten Einfluss auf deren physikochemischen Eigenschaften. Beispielsweise wurden in Modellreaktionen veränderte Wasserbindekapazitäten, Gelbildungseigenschaften, Emulsionsfähigkeiten, Schaumstabilitäten oder Löslichkeiten auf die Quervernetzungen von Proteinen zurückgeführt.^{356,432,433} In diesem Kontext sind die unkontrollierten und nicht-enzymatischen Proteinquervernetzungen, welche durch die Maillard-Reaktion und Lipidperoxidation hervorgerufen werden, von besonderer Bedeutung. Hierbei ist auch die Betrachtung der Änderungen der Polaritäten von Relevanz. So bringen die stark basischen Amidin-AGEs sowie die Imidazol-AGEs einen positiven Ladungsschwerpunkt in die Proteinstruktur ein. Von einer mechanistischen Sichtweise aus ist auch die unterschiedliche Tendenz zu inter- und intramolekularer Proteinquervernetzungen durch unterschiedliche Carbonylverbindungen interessant. Beispielsweise deuteten Modellsysteme unter Beteiligung von RNase darauf hin, dass GA überwiegend intermolekulare *crosslink*-AGEs ausbildete, während GO zu intramolekularen *crosslink*-AGEs führte.⁴³⁴ Die positionsspezifische Bestimmung einzelner *crosslink*-AGEs innerhalb der Proteinstruktur ist grundsätzlich mittels *Proteomics* möglich und stellt einen wichtigen Aspekt für das tiefere Verständnis der Protein-

Quervernetzung auf einer molekularen Ebene dar. Aufgrund der komplexen experimentellen Herausforderungen beschränkten sich die bisher erhobenen Daten aus der Literatur jedoch auf einfache Modellreaktionen.^{435,436} Das Verständnis der mechanistischen Bildungswege stellt auch die Grundlage dar, um die nicht-enzymatischen Proteinquervernetzungen lebensmitteltechnologisch zu kontrollieren. Hierbei ist die umfassende Charakterisierung der relevanten *crosslink*-AGEs nötig, wobei die vorliegende Arbeit neben der Quantifizierung bereits bekannter Proteinmodifikationen auch zur Etablierung der GO- und MGO-Amidin-AGEs beitrug.

4.3.2 Proteinquervernetzungen durch GO, MGO und MDA in Lebensmitteln

Die ersten Nachweise von Maillard *crosslink*-AGEs wurden *in vivo* vor etwa 30 Jahren durch die Identifikation von Pentosidin, GOLD und MOLD in Plasma- sowie Augenlinsenproteinen erbracht. Hierbei konnte bereits frühzeitig eine stetige Modifikation endogener Proteine durch diese *crosslink*-AGEs mit der Alterung sowie mit verschiedenen pathophysiologischen Krankheitsbildern wie Diabetes, Katarakt oder Niereninsuffizienz korreliert werden.⁴³⁷⁻⁴⁴² Es zeigte sich jedoch, dass auch Plasmaproteine von gesunden Probanden durch GOLD (~7-9 mg/kg Protein), MOLD (~11-88 mg/kg Protein) und Pentosidin (~0,4-1 mg/kg Protein) modifiziert waren.^{437-439,442,443} Spätere Untersuchungen erweiterten das Spektrum an *crosslink*-AGEs *in vivo* durch den Nachweis von GOLLA, MOLLA, GODIC, MODIC, DODIC und Glucosepan in Proteinen von verschiedenen Gewebeproben sowie teilweise auch in ihrer freien Form in humanem Plasma.^{12,21,230,423,444} In Kollagen von diabetischen Patienten erreichte Glucosepan eine Konzentration von bis zu 1926 mg/kg Protein und überstieg damit weitere *crosslink*-AGEs um Größenordnungen.⁴⁴⁴ Über die Bedeutung von *crosslink*-AGEs in Lebensmitteln ist jedoch weniger bekannt und die Quantifizierung beschränkte sich im Wesentlichen auf Backwaren, Snackprodukte sowie Fleisch (Tabelle 22).¹⁶ Biemel et al. konnte in einer Reihe von Snackprodukten GOLD und MOLD identifizieren, welche gegenüber GODIC und MODIC um Faktoren von ca. 5-10 geringer konzentriert waren.⁴⁴⁵ Neuere Untersuchungen konnten in Kartoffelchips m-DLP als einen Vertreter der Pyridin-*crosslink*-AGEs identifizieren, wobei sich die Quantifizierung jedoch auf Modellinkubationen beschränkte.¹⁴ Die Gehalte an Pentosidin hingegen lagen in rohen und gerösteten Mandeln unterhalb der Nachweisgrenze.⁴⁴⁶

Tabelle 22: Konzentrationen von GO- und MGO-*crosslink*-AGEs in Lebensmitteln.

Matrix	AGE	AGE-Gehalt [mg/kg Protein]	Literatur
Brötchen	MOLA	2,03	55
	DODIC	4,75	
Gerösteter Kaffee		10,8-39,9	
Brezeln	Pentosidin	9,3-22,8	447
Brot-Kruste		0,4-2,6	
UHT-Milch, gelagert bei 37°C für 12 Wochen		4	
Mariniertes, gebratenes Schweinefleisch	Pentosidin	14,0-26,1	448
Snackprodukte (Butterkeks, Salzstangen)	GODIC	11-57	445
	MODIC	44-151	
	DODIC	8-36	
	Glucosepan	8-47	

4.3.2.1 Qualitativer Nachweis von Amidin-AGEs

Der Nachweis von *crosslink*-AGEs in Lebensmitteln stellt in besonderem Maße eine instrumentell-analytische Herausforderung dar. Zum einen werden *crosslink*-AGEs gegenüber monovalenten AGEs quantitativ in deutlich geringeren Konzentrationen gebildet. Zum anderen erschwert die allgemein hohe Matrixbelastung in Lebensmitteln die massenspektrometrische Quantifizierung von AGEs. Im Gegensatz zu den in der Literatur oftmals beschriebenen direkten salzsauren Hydrolysen von verschiedenen Lebensmitteln setzte die vorliegende Arbeit ein besonderes Augenmerk auf die Isolationen sowie Aufreinigungen der Proteinfractionen, bevor diese hydrolysiert wurden. Daneben ermöglichte der Zusatz von HFBA als Ionenpaarreagenz eine starke Retention von *crosslink*-AGEs auf einer analytischen RP-HPLC-Säule, welche die Ionensuppressionen durch coeluerende Aminosäuren deutlich verminderte. In Kombination ermöglichten beide Strategien die empfindlichen Quantifizierungen von *crosslink*-AGEs und bieten eine Erklärungsmöglichkeit für die erstmaligen Nachweise verschiedener *crosslink*-AGEs in den entsprechenden Matrices.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von GO, MGO sowie MDA auf die Quervernetzung von Fleisch- als auch Backwarenproteinen untersucht. Die Isolation der Proteine erfolgte stets in vollständig homogenisierten Proben, sodass keine Diskriminierung oder Selektion von besonders glykierten „Hot-Spots“ erfolgte. Die Varianz wurde durch das wiederholte Backen bzw. Braten eines Lebensmittels in Mehrfachbestimmungen vorgegeben und es wurden *crosslink*-AGEs sowohl nach einer sauren als auch enzymatischen Proteinhydrolyse analysiert. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten erstmalig Amidin-AGEs als eine neue Klasse von *crosslink*-AGEs in Proteinen von Fleisch als auch Backwaren massenspektrometrisch quantifiziert werden. Beispielhaft werden in Abbildung 42 die charakteristischen Massenspektren von hydrolysierten Proteinen sowie der authentischen Referenzstrukturen dargestellt, welche durch *collision induced dissociation* (CID) Experimente erhalten wurden.

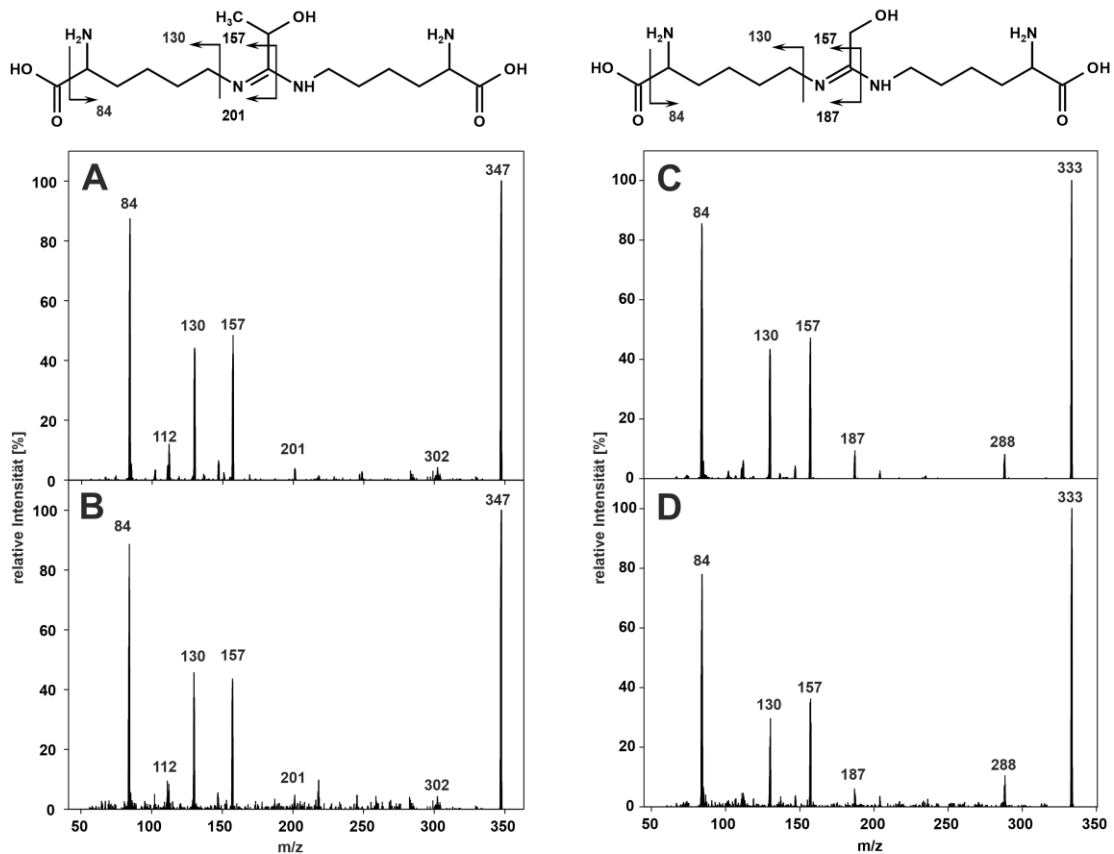


Abbildung 42: Verifizierung von GLA und MGLA durch massenspektrometrische CID-Spektren. MGLA-Standard (A), Extrakt von sauer hydrolysierten Fleischproteinen (B), GLA-Standard (C), Extrakt von sauer hydrolysierten Butterkekse (D).

4.3.2.2 Quantitativer Nachweis von MGO und GO-crosslink-AGEs in Lebensmitteln

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die bisher bereits strukturell charakterisierten *crosslink*-AGEs, welche sich aus den Isomerisierungs- und Cyclisierungsreaktionen von GO und MGO mit Lysin sowie Arginin ergeben, in Proteinen von Fleisch- und Backwaren zu quantifizieren. Von einer mechanistischen Sichtweise aus ließ sich somit erstmalig nahezu die komplette CML- und CEL-Isomerisierungskaskade (Abbildung 14) in Lebensmitteln abbilden. In den Fleischproben zeigten *crosslink*-AGEs, welche sich aus den Reaktionen von MGO ergaben, doppelte bis fünffach höhere Gehalte als die respektiven GO-*crosslink*-AGEs. Dies ließ sich direkt mit den höheren Konzentrationen von MGO gegenüber GO im Fleisch erklären und bestätigten die Ergebnisse der Quantifizierung der monovalenten-AGEs, welche in Kapitel 4.1 diskutiert wurden. Aus quantitativer Sicht waren die Amid-AGEs GOLA (~6 mg/kg Protein) und MOLA (~31 mg/kg Protein) die bedeutendsten *crosslink*-AGEs. Interessanterweise überstiegen die Konzentrationen von MOLA in Fleischproteinen somit etwa um Faktor 15 die bisher gemessenen Gehalte in Brötchen (Tabelle 22).⁵⁵ MODIC und MOLD hingegen ergaben nach 8 min Bratzeit von Fleisch mit 3 mg/kg Protein etwa dieselben Gehalte, wobei diese deutlich unterhalb der für Snackprodukte beschriebenen Gehalte von 44-151 mg/kg Protein lagen.⁴⁴⁵ Hingegen erreichte das GO-Pendant GOLD Konzentrationen

von etwa 1,5 mg/kg Protein, während GODIC nicht nachweisbar war. Die Quantifizierung von MDA-Lys₂ (1,9-8,1 mg/kg Protein) gab hierbei auch einen ersten Hinweis für die Bedeutung von *crosslink*-AGEs in gebratenem Fleisch.

Tabelle 23: Bildung von *crosslink*-AGEs durch das Braten von Hackfleisch.

	Roh	3 min	Bratzeit	
			5 min	8 min
[mg AGE/ kg Protein]				
GO-AGEs				
GLA	n.w.	n.w.	0,43 ± 0,13	0,70 ± 0,10
GOLD	n.w.	n.w.	0,83 ± 0,26	1,53 ± 0,38
GOLA	n.w.	2,7 ± 0,7	5,6 ± 2,1	5,9 ± 1,2
GODIC	n.w.	n.w.	n.w.	n.w.
MGO-AGEs				
MGLA	n.w.	n.w.	0,61 ± 0,15	0,82 ± 0,17
MOLD	n.w.	n.w.	1,27 ± 0,31	2,89 ± 0,51
MOLA	n.w.	4,3 ± 1,1	29,2 ± 11,0	31,4 ± 5,9
MODIC	n.w.	0,4 ± 0,1	3,0 ± 1,1	3,0 ± 0,8

In den Waffeln erfolgte die Bildung der *crosslink*-AGEs überwiegend innerhalb der ersten fünf Minuten des Backens, während mit weiterer Backzeit die Gehalte entweder konstant blieben oder nur noch geringfügig zunahmen. Wie auch bereits in Kapitel 4.2.1 für freies GO und MGO sowie der abgeleiteten monovalenten AGEs beschrieben wurde, zeigten Waffeln mit Zusatz von Leinöl, Sonnenblumenöl oder Kokosfett ein annähernd identisches Muster an *crosslink*-AGEs (Tabelle 24). GO- und MGO-AGEs trugen annähernd zu gleichen Teilen zur Proteinquervernetzung in Waffeln bei. Beispielsweise lagen in den Waffeln die mittleren Konzentrationen von GLA (0,28-0,37 mg/kg) und GOLD (1,95-2,35 mg/kg) nach 10 min Bratzeit in einer Größenordnung mit MGLA (0,58-0,62 mg/kg) und MOLD (2,47-2,88 mg/kg). Innerhalb der quantifizierten *crosslink*-AGEs stellte GODIC eine Ausnahme dar und zeigte eine annähernd lineare Zunahme der Konzentration während der gesamten Backzeit. Nach 10 min überstiegen die Gehalte von GODIC (8,4-11,8 mg/kg Protein) deutlich die Konzentrationen des MGO-Pendants MODIC (3,4-3,9 mg/kg Protein). Die Amid-AGEs GOLA und MOLA wurden hingegen in der vorliegenden Arbeit nicht in den Waffelproteinen untersucht. Wie bereits in Kapitel 4.2.2 für MDA-Lys und NPO diskutiert wurde, korrelierte der Zusatz von Leinöl auch mit der verstärkten Bildung von MDA-Lys₂ in den Waffeln, welches eine lineare Zunahme mit der Backzeit zeigte. So erreichte MDA-Lys₂ nach 10 min in Leinöl-Waffeln eine Konzentration von ca. 12 mg/kg Protein und überstieg die Gehalte von Waffeln mit einem Zusatz von Sonnenblumenöl oder Kokosfett etwa um das Vierfache. Trotzdem lag MDA-Lys₂ in letzteren Waffeln mit einem Gehalt von 2,15-2,88 mg/kg im Bereich der einzelnen GO- und MGO-Lysin *crosslink*-AGEs.

Tabelle 24: Bildung von *crosslink*-AGEs durch das Backen von Waffeln.

	Art des Teiges / Backzeit					
	LS / 5 min	SB / 5 min	KO / 5 min	LS / 10 min	SB / 10 min	KO / 10 min
	[mg AGE/ kg Protein]					
GO-AGEs						
GLA	0,27 ± 0,03	0,29 ± 0,05	0,26 ± 0,08	0,28 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,30 ± 0,06
GOLD	1,61 ± 0,10	1,80 ± 0,36	1,73 ± 0,13	1,95 ± 0,17	2,35 ± 0,13	2,11 ± 0,17
GODIC	3,50 ± 0,48	4,28 ± 1,63	5,41 ± 0,93	8,37 ± 3,20	9,45 ± 1,66	11,76 ± 2,29
MGO-AGEs						
MGLA	0,52 ± 0,07	0,77 ± 0,09	0,52 ± 0,09	0,62 ± 0,09	0,58 ± 0,22	0,61 ± 0,05
MOLD	1,90 ± 0,08	2,82 ± 0,65	2,15 ± 0,18	2,88 ± 0,54	2,71 ± 0,62	2,47 ± 0,34
MODIC	2,90 ± 0,21	2,88 ± 0,51	3,41 ± 0,77	3,91 ± 0,91	3,43 ± 0,55	3,97 ± 0,76
MDA-ALE						
MDA-Lys ₂	8,33 ± 1,33	2,15 ± 0,76	2,35 ± 0,46	14,34 ± 3,22	2,88 ± 1,03	2,35 ± 0,42

GLA und MGLA zeigten um Faktoren von 2-3,5 (Fleisch) bzw. 3,5-7 (Waffel) geringere Gehalte im Vergleich zu GOLD und MOLD. Zwischen diesen Produktgruppen zeigte sich auch eine Korrelation der Verhältnisse der Strukturen zueinander sowie der freien gemessenen Konzentration an 1,2-Dicarbonylen. Das Verhältnis von GOLD/GLA lag bei ~ 2 in Fleisch ($\sim 2,7$ mg/kg GO), während in der Waffel (~ 6 mg/kg GO) um Faktor von ca. 7 mehr GOLD als GLA gebildet wurde. Somit kann den Amidin-AGEs insbesondere bei den niedrigen 1,2-Dicarbonyl-Konzentrationen, welche oftmals in Lebensmitteln vorhanden sind eine höhere Bedeutung gegenüber Imidazol-AGEs zugeschrieben werden als in den zuvor beschriebenen Modellsystemen.¹²

Zusammengefasst nahmen GO und MGO eine äquivalente Bedeutung für Quervernetzungen von Proteinen ein, wobei die relativen Verhältnisse direkt von den Konzentrationen der freien 1,2-Dicarbonylen abhängig waren. Die Proteinquervernetzung in Lebensmitteln kann durch verschiedenste Strukturen beschrieben werden, welche sich aus der Maillard-Reaktion, Lipidperoxidation sowie weiteren enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktionswegen ergeben. Die quantitativen Bedeutungen einzelner AGE- bzw. ALE-Proteinmodifikationen sind im Vergleich zu *N*⁶-Glutamyllysin (Kapitel 2.5.1), LAL oder Histidinoalanin (Kapitel 2.5.2) vergleichsweise gering. Dennoch führt die Maillard-Reaktion und Lipidperoxidation zeitgleich zu einer kumulativen Proteinquervernetzung in Lebensmitteln, wobei die verantwortlichen *crosslink*-Strukturen sowie deren mechanistischen Bildungswege zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend aufgeklärt sind. In Ansätzen konnte z.B. die GO- bzw. MGO-Isomerisierungskaskade durch den Nachweis von DOLD und DODIC auch auf 3-DG übertragen werden.^{226,227,445} Potentiell ergibt sich in diesem Reaktionsschema folgend auch die Bildung von *deoxyglucosone lysine amide* oder *deoxyglucosone lysine amidine*. Weitere strukturelle Pendants sollten sich aus den Reaktionen von Proteinen mit 2-Hydroxyalkenalen ergeben, welche leicht zu den entsprechenden 1,2-Dicarbonyl-Strukturen

oxidiert werden können. Beispielsweise wurde bereits für 2-Hydroxyheptanal das mechanistische Pendant zu den Imidazol-*crosslinks* in Modellsystemen nachgewiesen.³²⁶ Auf der anderen Seite sind auch verschiedene Lipid-spezifische *crosslink*-Proteinmodifikationen bekannt, deren Identifizierung sich bisher jedoch lediglich auf Modellsysteme begrenzte. Von einem modernen Verständnis aus verlaufen diese nicht-enzymatischen Proteinquervernetzungen in Lebensmitteln somit durch zahlreiche parallele Reaktionswege, deren individuelle Bedeutungen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur zu einem kleinen Teil verstanden sind.

5 Zusammenfassung

Im Zuge der Maillard-Reaktion kommt es durch die Reaktionen zwischen 1,2-Dicarbonylen und den Protein-Seitenketten von Lysin und Arginin zu der irreversiblen Ausbildung einer heterogenen Gruppe an stabilen Proteinmodifikationen, welche unter der Bezeichnung Advanced Glycation End Products (AGEs) zusammengefasst werden. In Analogie hierzu werden auch im Zuge der Lipidperoxidation eine Vielzahl von reaktiven Carbonyl-Strukturen gebildet, welche gleichermaßen Proteine nicht-enzymatisch modifizieren. Die vorliegende Arbeit setzte ihren Fokus auf die Quantifizierung von stabilen Proteinmodifikationen, welche sich aus den Reaktionen von Carbonylverbindungen (GO, MGO und MDA) mit den nucleophilen Protein-Seitenketten von Lysin und Arginin ergeben. Der Nachweis und die Quantifizierung dieser Proteinmodifikationen erfolgte hierbei sowohl nach einer salzsaurer als auch enzymatischen Hydrolyse von isolierten Proteinfractionen von Fleisch und Backwaren mittels HPLC-MS/MS. Für die Einordnung der mechanistischen Hintergründe der Bildung von Proteinmodifikationen wurden parallel Methoden zum Nachweis und der Quantifizierung von Carbonylverbindungen sowie verschiedener Metabolite entwickelt.

In einem ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte in einem Bratversuch gezeigt werden, dass die Grillzeit von Fleisch direkt mit strukturellen Veränderungen der N^6 -Aminogruppe von proteingebundenem Lysin korrelierte. Es zeigte sich, dass in gebratenem Fleisch Proteine überwiegend durch MGO modifiziert wurden, während GO-Proteinmodifikationen quantitativ eine deutlich geringere Relevanz hatten. Dies wurde durch die unterschiedlichen Bildungswege der 1,2-Dicarbonyle GO und MGO erklärt. Während GO durch die Fragmentierung von Kohlenhydraten aus dem Fleisch hervorging, wurde der Hauptbildungsweg von MGO auf die Fragmentierung der Triosephosphate G3P und DHAP zurückgeführt, welche im Fleisch endogen vorhanden waren. Die vorliegende Arbeit enthüllte N^6 -Lactoyllysin als die bisher quantitativ bedeutendste Lysin-Modifikation in gebratenem Fleisch, wobei die hohen Gehalte mit dem bisherigen mechanistischen Verständnis nicht durch die direkte Reaktion von MGO mit Lysin erklärt werden konnten. Stattdessen wurde auf Grundlage von Modellinkubationen postuliert, dass etwa 90% von N^6 -Lactoyllysin auf die nicht-enzymatische Acylierung von Lysin durch S-Lactoylglutathion zurückgeführt werden muss, welches erstmalig in Fleisch quantifiziert wurde und nicht-enzymatisch aus MGO und GSH beim Braten gebildet wurde.

In einem zweiten Teil wurde untersucht, welche quantitative Bedeutung die Oxidationen von Lipiden hinsichtlich der Bildung von Carbonyl-Strukturen sowie Proteinmodifikationen in Lebensmitteln einnehmen. In unterschiedlich komplexen

Modellsystemen wurden zunächst kommerzielle Öle (Leinöl, Sonnenblumenöl, Kokosfett), welche sich deutlich in ihrem Anteil an ungesättigten Fettsäuren unterschieden, bei 50°C bzw. 150°C erhitzt. Aus den Oxidationen der verschiedenen Öle gingen nur sehr geringe Mengen an GO und MGO hervor, welche von MDA um Faktoren von 30-100 überstiegen wurden. Gleichermaßen war die Fragmentierung von Lipiden im direkten Vergleich zu Kohlenhydraten hinsichtlich der Bildung von GO- und MGO-AGEs quantitativ nicht von Bedeutung. In einem Lebensmittelmodell wurden direkt die qualitativen und quantitativen Anteile von Lipiden in Teigen durch den Zusatz von unterschiedlichen Ölen moduliert. Die Stabilität der Lipidfraktion gegenüber Oxidationen wurde folgend beim Backen von Waffeln (150°C, 3-10 min) untersucht. Der Anteil an ungesättigten Fettsäuren korrelierte direkt mit dem Gehalt des freien sowie proteingebundenen MDAs in den Waffeln, wobei MDA-Lys eine quantitativ bedeutende MDA-Proteinmodifikation darstellte. Hingegen konnte die Zunahmen von GO, MGO sowie abgeleiteten Proteinmodifikationen nicht durch die Lipidperoxidation erklärt werden und stattdessen wurden diese überwiegend auf die Maillard-katalysierte Fragmentierung von Kohlenhydraten zurückgeführt.

In dem dritten Teil wurde speziell der Einfluss von GO, MGO und MDA auf die Proteinquervernetzung untersucht. Es konnten erstmalig authentische Referenzstandards (GLA, MGLA) der neuartigen Klasse der Amidin-AGEs synthetisiert sowie charakterisiert werden. Auf Grundlage von Modellinkubationen wurde der Bildungsmechanismus dieser Amidin-AGEs auf die nicht-oxidativen Isomerisierungsreaktionen von Lysin mit 1,2-Dicarbonylen zurückgeführt. Sowohl GLA als auch MGLA konnten in Fleisch- und Waffelproteinen quantifiziert werden, wobei die Amidin-AGEs gegenüber den Imidazol-AGEs GOLD und MOLD um Faktoren von 2-7 geringere Gehalte zeigten. Der individuelle Beitrag von GO- und MGO-*crosslink*-AGEs korrelierte allgemein direkt mit der Verfügbarkeit der einzelnen 1,2-Dicarbonylverbindungen und war, wie auch das Verhältnis einzelner AGEs zueinander, von der entsprechenden Matrix abhängig. Beispielsweise überstiegen in gebratenem Fleisch die MGO-*crosslink*-AGEs um Faktoren von 1,2-5,3 die entsprechenden GO-Pendants. Insbesondere die Amid- und Imidazolinon-AGEs nahmen eine wichtige Rolle bei der Proteinquervernetzung in Lebensmitteln ein. Daneben konnten in Fleisch- und Waffelproteinen auch erstmalig die für MDA charakteristische *crosslink*-Struktur MDA-Lys₂ quantifiziert werden, welche in einem Konzentrationsbereich mit GO- und MGO-AGEs lag. Es zeigte sich, dass kurzkettige Dicarbonylverbindungen eine wichtige Rolle hinsichtlich der Proteinquervernetzung einnehmen, wobei die vorliegende Arbeit tiefere Einblicke in die quantitative Bedeutung einzelner Strukturen ermöglichte.

6 Summary

1,2-Dicarbonyl compounds are the central intermediates among the Maillard reaction cascade. The subsequent condensations of 1,2-dicarbonyl compounds with the protein side chains of lysine and arginine lead to the irreversible formation of a heterogeneous group of stable protein modifications, which are summarized under the term Advanced Glycation End Products (AGEs). Similarly, in the course of lipid peroxidation, a variety of short-chained and highly reactive carbonyl compounds are formed, which also cause non-enzymatic protein modification. The present work focuses on the quantitation of stable protein modifications resulting from the reactions of selected carbonyl compounds (GO, MGO, and MDA) with the nucleophilic protein side chains of lysine and arginine. After both hydrochloric acid and enzymatic hydrolysis of isolated proteins from meat and bakery products, the detection and quantitation of the aforementioned protein modifications were performed using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Furthermore, the formation and degradation of carbonyl compounds as well as various other metabolites during the processing of foods were analyzed to elucidate underlying mechanistic pathways of non-enzymatic protein modifications in foods.

In the first part of the present work, the formations of AGEs during the grilling of minced meat, resulting from the reactions of GO and MGO with lysine, were investigated. In particular, MGO-derived non-enzymatic protein modifications increased with prolonged grilling times. In contrast, GO-derived AGEs were quantitatively less important, which is in line with overall lower yields of free GO compared to MGO in grilled meat. It was assumed that glyoxal is mechanistically formed by the Maillard-catalyzed fragmentations of carbohydrates. Contrary to that, the main formation pathway of MGO was ascribed to fragmentations of triose phosphates G3P and DHAP, which are endogenously present in raw meat. From a quantitative point of view, *N*⁶-lactoyl lysine was found to be the most important AGE in grilled meat. However, the high levels of *N*⁶-lactoyl lysine could not be mechanistically ascribed to the well-known non-enzymatic reaction of MGO with lysine via isomerization. Instead, the present study postulates that about 90% of the protein-bound *N*⁶-lactoyl lysine may be traced back to the non-enzymatic acylation of lysine via *S*-lactoylglutathione, which was formed non-enzymatically from MGO and GSH during grilling of meat.

In the second part of the present work, the impact of lipid peroxidation on the formation of GO and MGO as well as follow-up products was investigated. Model incubations were carried out, in which different oils were thermally oxidized at 150°C and 50°C, respectively. In both model systems, only small amounts of GO and MGO were formed,

which were exceeded by MDA by factors between 30 and 100. On the other hand, the fragmentation of lipids was found to be negligible in direct comparison to carbohydrate fragmentation concerning the formation of GO- as well as MGO-AGEs in simplified model incubations. In a more complex model system, the raw doughs used for baking wafers (150°C), were directly doped with different oils. There was a clear correlation between the content of unsaturated lipids in the dough and the concentration of free as well as protein-bound MDA in wafers. In contrast, the increase in GO- and MGO-derived protein modifications during the baking of wafers was independent of lipid peroxidation and, instead, was solely ascribed to Maillard-catalyzed fragmentation of carbohydrates.

In the third part, the contributions of GO, MGO, and MDA concerning protein cross-linking were investigated. First representatives (GLA, MGLA) of the novel class of amidine AGEs were successfully synthesized and structures were verified spectroscopically. Based on different model incubations, the formation mechanism of amidine AGEs was ascribed exclusively to a non-oxidative isomerization reaction of lysine with 1,2-dicarbonyl compounds, which resembles the Cannizzaro reaction in the result. Both GLA and MGLA were quantitated in meat and wafer proteins, however, they showed lower levels by factors between 2 and 7 in direct comparison to the imidazole structures GOLD and MOLD. Overall, GO and MGO take a central role in protein cross-linking in foods. There was a clear correlation between the concentrations of the 1,2-dicarbonyl compounds, which are different among the foods analyzed, and the formation of respective cross-link-AGEs. For instance, in grilled meat, MGO cross-link-AGEs exceeded the corresponding GO structures by factors between 1,2 and 5,3. In addition, MDA-Lys₂, which is an MDA-specific cross-link-ALE, was quantitated for the first time in meat and wafer proteins at concentrations similar to those of GO- and MGO-cross-links. Short-chained 1,2-dicarbonyl compounds are shown to play an important role with respect to protein cross-linking, and the present study provides deeper insights into the quantitative significance of individual AGE- as well as ALE-cross-links.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung des Amadori-Produkts sowie ausgewählter 1,2-Dicarbonyle im Zuge der Maillard-Reaktion am Beispiel der Reaktionen von Glucose und Lysin.	3
Abbildung 2: Radikalische Oxidation von Linolsäure und Ausbildung von Hydroperoxiden.	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des radikalischen Kettenmechanismus der Autoxidation von Lipiden.	7
Abbildung 4: Darstellung einer Auswahl an Carbonyl-Strukturen, welche im Zuge der Lipidperoxidation gebildet werden.	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mechanismus der α -Fragmentierung am Beispiel des 9-Hydroperoxids der Linolsäure.	8
Abbildung 6: Darstellung der Keto-Enol-Tautomerie von MDA.	14
Abbildung 7: Postulierter Bildungsmechanismus von MDA durch Fragmentierung eines bicyclischen Endoperoxids.	15
Abbildung 8: Darstellung verschiedener Derivatisierungsreaktionen für MDA.	17
Abbildung 9: Strecker-Abbau von Aminosäuren durch 1,2-Dicarbonyle (A). Abbaumechanismus von Aminosäuren durch 4,5-Epoxy-2-alkenalen unter Bildung von Strecker-Aldehyden (B).	20
Abbildung 10: Bildung von Amid-AGEs im Zuge der amininduzierten β -Fragmentierung von 1-Desoxyglucoson (A) bzw. Dihydroascorbinsäure (B).	22
Abbildung 11: Bildung von Amid-AGEs durch die amininduzierte α -Spaltung der 2,3-Diketogulonsäure und 2,3-Xylodiolose.	23
Abbildung 12: Bildung von AGEs durch die Fragmentierungen von Amadori-Produkte.	23
Abbildung 13: Mechanismus der enzymatischen und nicht-enzymatischen Acylierung von Lysin (A) und Darstellung ausgewählter Amid-AGEs (B).	24
Abbildung 14: Bildung von GO- und MGO-AGEs durch Isomerisierungs- sowie Cyclisierungsreaktionen.	27
Abbildung 15: Bildungen von Pyrrolin, Hydroxymethylfurfural, Furfural und Formylin aus den Reaktionen von 3-Desoxyzuckern mit und ohne Beteiligung von Lysin.	28
Abbildung 16: Bildung von Glucosepan aus dem Lederer's Glucoson (A) bzw. Pentosidin aus dem Lederer's Pentoson (B).	29
Abbildung 17: Postulierter Bildungsmechanismus von stabilen Amid-Strukturen aus Pyridoxamin und 13-Hydroperoxid (A) bzw. 9-Hydroperoxid (B) der Linolsäure.	30
Abbildung 18: Postulierter oxidativer Bildungsmechanismus von Amid-AGEs aus den Reaktionen von Alkanalen mit Lysin.	31
Abbildung 19: Darstellung ausgewählter MDA-Proteinmodifikationen.	32
Abbildung 20: Bildung von stabilen Lysin-Modifikationen durch die Reaktionen von Lysin mit 4-HNE und 4-Oxononenal.	35
Abbildung 21: Bildung stabiler Aminosäure-Modifikationen durch die Reaktionen von Aminosäuren mit 4-ONE.	36
Abbildung 22: Bildung stabiler Lysin-Modifikationen durch die Reaktion von Lysin mit 4-HPNE.	37
Abbildung 23: Bildung stabiler Lysin-Modifikationen durch die Reaktion von Lysin mit EP-decenal und EP-heptenal.	38
Abbildung 24: Bildung stabiler Lysin-Pyridin-Strukturen im Zuge der Lipidperoxidation (A) sowie Maillard-Reaktion (B). Abkürzungen: 2-Ammonio-6-(3-oxidopyridinium-1-yl)hexanoat (OP-Lysin); lactaldehyde-derived	

pyridinium-type lysine adduct (LAPL), glyceraldehyde-derived pyridinium (GLAP) – 2-Ammonio-6-[4-(hydroxymethyl)-3-oxidopyridinium-1-yl]-hexanoate (HOP), 1-(5-Amino-5-carboxypentyl)-3-(5-amino-5-carboxy-pentylamino)pyridinium salt (meta-DLP), lactaldehyd-derived lysine dimer (LAK2).	39
Abbildung 25: Bildung von heterocyclischen Lysin-Modifikationen aus den Reaktionen von Lysin mit Acrolein und Crotonaldehyd (A), 2-Hexenal, 2-Heptenal und 2-Nonenal (B) sowie Hexanal (C).	42
Abbildung 26: Ausbildung von Isopeptidbindungen zwischen Glutamin und Lysin katalysiert durch die Transglutaminase.	43
Abbildung 27: Bildung stabiler Proteinmodifikationen durch die Reaktionen von Dehydroalanin mit Aminosäuren.	44
Abbildung 28: Veränderung der Kerntemperatur (A) sowie des Bratverlusts (B) beim Grillen (200°C) von Schweinehackfleisch.	47
Abbildung 29: Bildung von GO- und MGO-AGEs während des Grillens von Schweinehackfleisch.	48
Abbildung 30: Veränderungen der Konzentrationen von 1,2-Dicarbonylen (A) sowie Kohlenhydraten (B) während des Grillens von Schweinehackfleisch.	50
Abbildung 31: Veränderungen der Konzentrationen der Triosephosphate G3P und DHAP sowie Bildung von MGO beim Grillen von Schweinehackfleisch (A). Schematische Darstellung der Bildung von MGO aus Triosephosphaten (B).	52
Abbildung 32: Bildungswege von N ⁶ -Lactoyllysin durch die Reaktionen von Lysin mit MGO bzw. Milchsäure.	54
Abbildung 33: Darstellung der enzymatischen und nicht-enzymatischen Reaktion von MGO mit GSH.	55
Abbildung 34: Darstellung eines HPLC-MS/MS Chromatogramms [m/z 380 → 233 (M+H ⁺)] eines wässrigen Extraktes von rohem (A) und 5 min gegrilltem Schweinehackfleisch (B). Einfluss der Bratzeit auf die Konzentrationen von Lactoylglutathion-Isomeren in Schweinehackfleisch (C).	56
Abbildung 35: Bildung von N ⁶ -Lactoyllysin durch die Reaktion von Lysin mit MGO bzw. S-D-Lactoylglutathion. Inkubation von 40 mM N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphat (pH 7,4) mit 8 mM MGO bzw. 8 mM S-D-Lactoylglutathion bei 50°C (A). Inkubation von 40 mM N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphat (pH 6,0) mit 1,45 mM MGO bzw. 0,065 mM (22:1) und 0,118 mM (12:1) S-D-Lactoylglutathion bei 50°C (B).	57
Abbildung 36: Bildung von GO (A) und MGO (B) beim wasserfreien Erhitzen von Leinöl, Sonnenblumenöl und Kokosfett bei 150°C.	61
Abbildung 37: Zeitabhängige Veränderungen von GO (A) und MGO (B) während des Backens von Waffeln. Gehalte an GO-AGEs (C) und MGO-AGEs (D) in Waffeln, welche für 10 min für 150°C gebacken wurden.	63
Abbildung 38: Veränderungen der MDA-Gehalte in den Inkubationen von Leinöl, Sonnenblumenöl und Kokosfett. Emulsionssystem in Gegenwart von N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C (A) sowie Inkubation der reinen Öle bei 150°C (B).	65
Abbildung 39: Analyse von MDA in wässrigen Extrakten von Waffeln, welche mit unterschiedlichen Ölen dotiert wurden, nach Derivatisierung mittels 2-TBA. Zeitabhängige Konzentrationsänderungen von MDA in nativen Waffelextrakten (A) und alkalisch hydrolysierten Waffeln (B).	66
Abbildung 40: Bildung von AGEs durch Reaktion von GO und MGO mit Lysin.	69
Abbildung 41: Synthesestrategie der Amidin-AGEs GLA und MGLA.	70
Abbildung 42: Verifizierung von GLA und MGLA durch massenspektrometrische CID-Spektren. MGLA-Standard (A), Extrakt von sauer hydrolysierten Fleischproteinen (B), GLA-Standard (C), Extrakt von sauer hydrolysierten Butterkeksen (D).	77

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen von 1,2-Dicarbonylverbindungen in ausgewählten Lebensmittel-Matrices.	5
Tabelle 2: Konzentrationen von Hexanal, 2,4-Decadienal, Propanal und 2,4-Heptadienal in Modellsystemen der Lipidperoxidation sowie in Lebensmitteln.	10
Tabelle 3: Konzentrationen von Acrolein und Crotonaldehyd in Modellsystemen sowie in Lebensmitteln. ..	11
Tabelle 4: Bildung von GO und MGO im Zuge der Lipidperoxidation in verschiedenen Modellsystemen.	14
Tabelle 5: Konzentrationen des freien sowie gebundenen MDAs in Plasmaproben von gesunden Probanden.	19
Tabelle 6: Konzentrationen von MDA, 4-HNE und 4-HHE in verschiedenen Lebensmitteln und Ölen.	20
Tabelle 7: Bildung von Amid-AGEs in Oxidations-Modellsystemen von ungesättigten Fettsäuren.	30
Tabelle 8: Konzentrationen von proteingebundenen MDA-Lys, CML und CEL in Gewebeproben sowie Plasma.	34
Tabelle 9: Konzentrationen von Histidinoalanin, LAL und Lanthionin in Lebensmitteln.	44
Tabelle 10: Nährstoffzusammensetzung von rohem Schweinehackfleisch.	47
Tabelle 11: Konzentrationen von CML und CEL in rohem sowie zubereitetem Fleisch.	49
Tabelle 12: Bildung von CML und CEL in den Inkubationen von 40 mM N ² -t-Boc-Lysin mit verschiedenen Zuckern (100 mM) in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C nach 48 h.	51
Tabelle 13: Bildung von N ⁶ -Lactoyllysin in Inkubationen von 40 mM N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer unter Zusatz von 8 mM N ² -Acetyl-Cystein bzw. GSH nach 24 h.	57
Tabelle 14: Fettsäurezusammensetzung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Pflanzenöle sowie der Lipidfraktion des Mehls.	59
Tabelle 15: Bildung von GO und MGO in wässrigen Emulsionssystemen in Gegenwart von N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C.	62
Tabelle 16: Bildung von MDA-Lys in wässrigen Emulsionssystemen in Gegenwart von N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 50°C.	65
Tabelle 17: Bildung von MDA-Proteinmodifikationen beim Backen von Leinöl-Waffeln.	67
Tabelle 18: Bildung von AGEs in den Inkubationen von 40 mM N ² -t-Boc-Lysin mit 40 mM GO in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C.	72
Tabelle 19: Bildung von CML und GLA in den Inkubationen von 100 mM Zucker mit 40 mM N ² -t-Boc-Lysin in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C nach 21 Tagen.	73
Tabelle 20: Stabilität von GO-AGEs unter den Bedingungen einer salzsauren Proteinhydrolyse (6 M HCl, 110°C, 20 h).	73
Tabelle 21: Inkubationen von Proteinen (6 mg/mL) mit 40 mM GO in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) bei 37°C für 7 Tage.	74
Tabelle 22: Konzentrationen von GO- und MGO-crosslink-AGEs in Lebensmitteln.	76
Tabelle 23: Bildung von crosslink-AGEs durch das Braten von Hackfleisch.	78
Tabelle 24: Bildung von crosslink-AGEs durch das Backen von Waffeln.	79

9 Literaturverzeichnis

- (1) Frankel, E. N. Lipid Oxidation. *Prog. Lipid Res.* **1980**, *19* (1–2), 1–22.
- (2) Ledl, F.; Schleicher, E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1990**, *29* (6), 565–594.
- (3) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (39), 10316–10329.
- (4) O'Brien, P. J.; Siraki, A. G.; Shangari, N. Aldehyde Sources, Metabolism, Molecular Toxicity Mechanisms, and Possible Effects on Human Health. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35* (7), 609–662.
- (5) Guillén, M. D.; Goicoechea, E. Toxic Oxygenated α,β -Unsaturated Aldehydes and Their Study in Foods: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2008**, *48* (2), 119–136.
- (6) Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard Reaction under Physiological Conditions. *Glycoconj. J.* **2016**, *33* (4), 499–512.
- (7) Vistoli, G.; De Maddis, D.; Cipak, A.; Zarkovic, N.; Carini, M.; Aldini, G. Advanced Glycooxidation and Lipoxidation End Products (AGEs and ALEs): An Overview of Their Mechanisms of Formation. *Free Radic. Res.* **2013**, *47* (suppl 1), 3–27.
- (8) Glomb, M. A.; Lang, G. Isolation and Characterization of Glyoxal - Arginine Modifications. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (3), 1493–1501.
- (9) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Novel Amidine Protein Cross-Links Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (28), 7960–7968.
- (10) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N6-Carboxymethyl Lysine and N6-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (8), 1898–1906.
- (11) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy-d-Erythro-Hexo-2,3-Diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (10), 6458–6464.
- (12) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (45), 41638–41647.
- (13) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of N α -Tert-Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (1), 394–401.
- (14) Rau, R.; Glomb, M. A. Novel Pyridinium Cross-Link Structures Derived from Glycolaldehyde and Glyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (14), 4434–4444.
- (15) Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Selected Food Items by Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Presentation of a Dietary AGE Database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145–1150.
- (16) Zhu, Y.; Snooks, H.; Sang, S. Complexity of Advanced Glycation End Products in Foods: Where Are We Now? *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (6), 1325–1329.
- (17) Gerrard, J. A. Protein–Protein Crosslinking in Food: Methods, Consequences, Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2002**, *13* (12), 391–399.

- (18) Henle, T. Protein-Bound Advanced Glycation Endproducts (AGEs) as Bioactive Amino Acid Derivatives in Foods. *Amino Acids* **2005**, *29* (4), 313–322.
- (19) Hellwig, M.; Henle, T. Release of Pyrraline in Absorbable Peptides during Simulated Digestion of Casein Glycated by 3-Deoxyglucosone. *Eur. Food Res. Technol.* **2013**, *237* (1), 47–55.
- (20) Hellwig, M.; Matthes, R.; Peto, A.; Löbner, J.; Henle, T. N- ϵ -Fructosyllysine and N- ϵ -Carboxymethyllysine, but Not Lysinoalanine, Are Available for Absorption after Simulated Gastrointestinal Digestion. *Amino Acids* **2014**, *46* (2), 289–299.
- (21) Hohmann, C.; Liehr, K.; Henning, C.; Fiedler, R.; Girndt, M.; Gebert, M.; Hulko, M.; Storr, M.; Glomb, M. A. Detection of Free Advanced Glycation End Products in Vivo during Hemodialysis. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (4), 930–937.
- (22) Tessier, F. J.; Niquet-Léridon, C.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Genin, M.; Schmidt, A. M.; Grossin, N.; Boulanger, E. Quantitative Assessment of Organ Distribution of Dietary Protein-Bound ^{13}C -Labeled N ϵ -Carboxymethyllysine after a Chronic Oral Exposure in Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60* (11), 2446–2456.
- (23) Hellwig, M.; Auerbach, C.; Müller, N.; Samuel, P.; Kammann, S.; Beer, F.; Gunzer, F.; Henle, T. Metabolization of the Advanced Glycation End Product N- ϵ -Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic E. Coli Strains. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (7), 1963–1972.
- (24) Hellwig, M.; Bunzel, D.; Huch, M.; Franz, C. M. A. P.; Kulling, S. E.; Henle, T. Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (30), 6723–6730.
- (25) Toda, M.; Hellwig, M.; Henle, T.; Vieths, S. Influence of the Maillard Reaction on the Allergenicity of Food Proteins and the Development of Allergic Inflammation. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2019**, *19* (1), 4.
- (26) Teodorowicz, M.; van Neerven, J.; Savelkoul, H. Food Processing: The Influence of the Maillard Reaction on Immunogenicity and Allergenicity of Food Proteins. *Nutrients* **2017**, *9* (8), 835.
- (27) Goldberg, T.; Cai, W.; Peppas, M.; Dardaine, V.; Baliga, B. S.; Uribarri, J.; Vlassara, H. Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. *J. Am. Diet. Assoc.* **2004**, *104* (8), 1287–1291.
- (28) Uribarri, J.; Woodruff, S.; Goodman, S.; Cai, W.; Chen, X.; Pyzik, R.; Yong, A.; Striker, G. E.; Vlassara, H. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **2010**, *110* (6), 911-916.e12.
- (29) Hellwig, M.; Humpf, H.-U.; Hengstler, J.; Mally, A.; Vieths, S.; Henle, T. Quality Criteria for Studies on Dietary Glycation Compounds and Human Health. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (41), 11307–11311.
- (30) Henning, C.; Smuda, M.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Molecular Basis of Maillard Amide-Advanced Glycation End Product (AGE) Formation in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (52), 44350–44356.
- (31) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract. *Biochemistry* **2015**, *54* (15), 2500–2507.

- (32) Baldensperger, T.; Eggen, M.; Kappen, J.; Winterhalter, P. R.; Pfirrmann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Posttranslational Protein Modifications in Aging of Subcellular Compartments. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 1–11.
- (33) Poulsen, M. W.; Hedegaard, R. V.; Andersen, J. M.; de Courten, B.; Bügel, S.; Nielsen, J.; Skibsted, L. H.; Dragsted, L. O. Advanced Glycation Endproducts in Food and Their Effects on Health. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 10–37.
- (34) Schulz, A.; Trage, C.; Schwarz, H.; Kroh, L. W. Electrospray Ionization Mass Spectrometric Investigations of α -Dicarbonyl Compounds—Probing Intermediates Formed in the Course of the Nonenzymatic Browning Reaction of L-Ascorbic Acid. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *262* (3), 169–173.
- (35) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Analysis and Chemistry of Novel Protein Oxidation Markers in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (18), 4692–4701.
- (36) Gobert, J.; Glomb, M. A. Degradation of Glucose: Reinvestigation of Reactive α -Dicarbonyl Compounds †. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (18), 8591–8597.
- (37) 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* (1), 109–116.
- (38) Yaylayan, V. A.; Keyhani, A. Origin of Carbohydrate Degradation Products in L-Alanine/d-[13C]Glucose Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (6), 2415–2419.
- (39) Voigt, M.; Smuda, M.; Pfahler, C.; Glomb, M. A. Oxygen-Dependent Fragmentation Reactions during the Degradation of 1-Deoxy-d-Erythro-Hexo-2,3-Diulose. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (9), 5685–5691.
- (40) Weenen, H. Reactive Intermediates and Carbohydrate Fragmentation in Maillard Chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62* (4), 393–401.
- (41) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation Pathways during Maillard-Induced Carbohydrate Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (43), 10198–10208.
- (42) Elliott, W. H. Methylglyoxal Formation from Aminoacetone by Ox Plasma. *Nature* **1960**, *185* (4711), 467–468.
- (43) Sartori, A.; Garay-Malpartida, H. M.; Forni, M. F.; Schumacher, R. I.; Dutra, F.; Sogayar, M. C.; Bechara, E. J. H. Aminoacetone, a Putative Endogenous Source of Methylglyoxal, Causes Oxidative Stress and Death to Insulin-Producing RINm5f Cells. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21* (9), 1841–1850.
- (44) Urata, G.; Granick, S. Biosynthesis of α -Aminoketones and the Metabolism of Aminoacetone. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238* (2), 811–820.
- (45) Casazza, J. P.; Felver, M. E.; Veech, R. L. The Metabolism of Acetone in Rat. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259* (1), 231–236.
- (46) Lyles, G. A.; Chalmers, J. The Metabolism of Aminoacetone to Methylglyoxal by Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase in Human Umbilical Artery. *Biochem. Pharmacol.* **1992**, *43* (7), 1409–1414.
- (47) Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of Methylglyoxal from Triose Phosphates. Investigation Using a Specific Assay for Methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212* (1), 101–105.

- (48) Richard, J. P. Kinetic Parameters for the Elimination Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase and an Estimation of the Reaction's Physiological Significance. *Biochemistry* **1991**, 30 (18), 4581–4585.
- (49) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of α -Dicarbonyl Compounds in Maillard Reaction Systems and in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (11), 5543–5550.
- (50) Kishikawa, N.; El-Maghrabey, M. H.; Kuroda, N. Chromatographic Methods and Sample Pretreatment Techniques for Aldehydes Determination in Biological, Food, and Environmental Samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2019**, 175, 112782.
- (51) Henning, C.; Liehr, K.; Girndt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Extending the Spectrum of α -Dicarbonyl Compounds in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2014**, 289 (41), 28676–28688.
- (52) Smuda, M.; Glomb, M. A. Novel Insights into the Maillard Catalyzed Degradation of Maltose. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59 (24), 13254–13264.
- (53) Maasen, K.; Scheijen, J. L. J. M.; Opperhuizen, A.; Stehouwer, C. D. A.; Van Greevenbroek, M. M.; Schalkwijk, C. G. Quantification of Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods and Drinks; Presentation of a Food Composition Database for Dicarbonyls. *Food Chem.* **2021**, 339, 128063.
- (54) Degen, J.; Hellwig, M.; Henle, T. 1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (28), 7071–7079.
- (55) Jost, T.; Henning, C.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, 69 (12), 3720–3731.
- (56) Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F. J. Analysis, Distribution, and Dietary Exposure of Glyoxal and Methylglyoxal in Cookies and Their Relationship with Other Heat-Induced Contaminants. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58 (5), 2966–2972.
- (57) Rakete, S.; Klaus, A.; Glomb, M. A. Investigations on the Maillard Reaction of Dextrins during Aging of Pilsner Type Beer. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62 (40), 9876–9884.
- (58) 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**, 52 (4), 483–489.
- (59) Atrott, J.; Haberlau, S.; Henle, T. Studies on the Formation of Methylglyoxal from Dihydroxyacetone in Manuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey. *Carbohydr. Res.* **2012**, 361, 7–11.
- (60) Spanneberg, R.; Salzwedel, G.; Glomb, M. A. Formation of Early and Advanced Maillard Reaction Products Correlates to the Ripening of Cheese. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (2), 600–607.
- (61) Adams, C. J.; Manley-Harris, M.; Molan, P. C. The Origin of Methylglyoxal in New Zealand Manuka (*Leptospermum Scoparium*) Honey. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344 (8), 1050–1053.
- (62) Riddle, V.; Lorenz, F. W. Nonenzymic, Polyvalent Anion-Catalyzed Formation of Methylglyoxal as an Explanation of Its Presence in Physiological Systems. *J. Biol. Chem.* **1968**, 243 (10), 2718–2724.
- (63) Frankel, E. N. Volatile Lipid Oxidation Products. *Prog. Lipid Res.* **1983**, 22 (1), 1–33.

- (64) Porter, N. A.; Caldwell, S. E.; Mills, K. A. Mechanisms of Free Radical Oxidation of Unsaturated Lipids. *Lipids* **1995**, *30* (4), 277–290.
- (65) Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lebensmittelchemie*; (6.Auflage); Springer-Lehrbuch; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2008, Seite 193-210.
- (66) Sousa, B. C.; Pitt, A. R.; Spickett, C. M. Chemistry and Analysis of HNE and Other Prominent Carbonyl-Containing Lipid Oxidation Compounds. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 294–308.
- (67) Kawai, Y.; Takeda, S.; Terao, J. Lipidomic Analysis for Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20* (1), 99–107.
- (68) Varlet, V.; Prost, C.; Serot, T. Volatile Aldehydes in Smoked Fish: Analysis Methods, Occurrence and Mechanisms of Formation. *Food Chem.* **2007**, *105* (4), 1536–1556.
- (69) Winter, C. K.; Segall, H. J.; Haddon, W. F. Formation of Cyclic Adducts of Deoxyguanosine with the Aldehydes Trans-4-Hydroxy-2-Hexenal and Trans-4-Hydroxy-2-Nonenal in Vitro. *Cancer Res.* **1986**, *46* (11), 5682–5686.
- (70) Galliani, G.; Pantarotto, C. The Reaction of Guanosine and 2'-Deoxyguanosine with Acrolein. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24* (41), 4491–4492.
- (71) Chung, F.-L.; Young, R.; Hecht, S. S. Formation of Cyclic 1,N2-Propanodeoxyguanosine Adducts in DNA upon Reaction with Acrolein or Crotonaldehyde. *Cancer Res.* **1984**, *44* (3), 990–995.
- (72) Chung, F.-L.; Hecht, S. S. Formation of Cyclic 1,N2-Adducts by Reaction of Deoxyguanosine with α -Acetoxy-N-Nitrosopyrrolidine, 4-(Carbethoxynitrosamino)Butanal, or Crotonaldehyde. *Cancer Res.* **1983**, *43* (3), 1230–1235.
- (73) Liao, H.; Zhu, M.; Chen, Y. 4-Hydroxy-2-Nonenal in Food Products: A Review of the Toxicity, Occurrence, Mitigation Strategies and Analysis Methods. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *96*, 188–198.
- (74) Matthews, R. F.; Scanlan, R. A.; Libbey, L. M. Autoxidation Products of 2,4-Decadienal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48* (11), 745–747.
- (75) Porter, N. A.; Mills, K. A.; Carter, R. L. A Mechanistic Study of Oleate Autoxidation: Competing Peroxyl H-Atom Abstraction and Rearrangement. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (15), 6690–6696.
- (76) Störmer, L.; Globisch, M.; Henle, T. Glycerol-Bound Oxidized Fatty Acids: Formation and Occurrence in Peanuts. *Eur. Food Res. Technol.* **2022**.
- (77) Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11* (1), 81–128.
- (78) Nogueira, M. S.; Scolaro, B.; Milne, G. L.; Castro, I. A. Oxidation Products from Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids during a Simulated Shelf Life of Edible Oils. *LWT* **2019**, *101*, 113–122.
- (79) Wu, H.-Y.; Lin, J.-K. Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products With Dabsylhydrazine by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (9), 1603–1612.

- (80) Suh, J. H.; Niu, Y. S.; Hung, W.-L.; Ho, C.-T.; Wang, Y. Lipidomic Analysis for Carbonyl Species Derived from Fish Oil Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2017**, *168*, 31–42.
- (81) Michalski, S. T.; Hammond, E. G. Use of Labeled Compounds to Study the Mechanism of Flavor Formation in Oxidizing Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1972**, *49* (10), 563–566.
- (82) Selke, E.; Rohwedder, W. K.; Dutton, H. J. Volatile Components from Trilinolein Heated in Air. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1980**, *57* (1), 25–30.
- (83) Läubli, M. W.; Bruttel, P. A.; Schalc, E. Bestimmung Der Oxidationsstabilität von Fetten Und Ölen – Vergleich Zwischen Der Active Oxygen Method (AOCS Cd 12–57) Und Der Rancimat-Methode. *Lipid / Fett* **1988**, *90* (2), 56–58.
- (84) Thüerer, A.; Granvogl, M. Generation of Desired Aroma-Active as Well as Undesired Toxicologically Relevant Compounds during Deep-Frying of Potatoes with Different Edible Vegetable Fats and Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (47), 9107–9115.
- (85) Konopka, U. C.; Guth, H.; Grosch, W. Potent Odorants Formed by Lipid Peroxidation as Indicators of the Warmed-over Flavour (WOF) of Cooked Meat. *Z Leb. Unters Forsch* **1995**, *201* (4), 339–343.
- (86) Kerler, J.; Grosch, W. Character Impact Odorants of Boiled Chicken: Changes during Refrigerated Storage and Reheating. *Z Leb. Unters Forsch* **1997**, *205* (3), 232–238.
- (87) Sun, H.; Peng, X.; Li, C.; Zhang, W.; Cao, J. Determination of 2,4-decadienal in Edible Oils Using Reversed-phase Liquid Chromatography and Its Application as an Alternative Indicator of Lipid Oxidation. *J. Food Sci.* **2020**, *85* (5), 1418–1426.
- (88) Cao, J.; Zou, X.-G.; Deng, L.; Fan, Y.-W.; Li, H.; Li, J.; Deng, Z.-Y. Analysis of Nonpolar Lipophilic Aldehydes/Ketones in Oxidized Edible Oils Using HPLC-QqQ-MS for the Evaluation of Their Parent Fatty Acids. *Food Res. Int.* **2014**, *64*, 901–907.
- (89) Gassenmeier, K.; Schieberle, P. Formation of the Intense Flavor Compound Trans -4,5-Epoxy-(E)-2-Decenal in Thermally Treated Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1994**, *71* (12), 1315–1319.
- (90) Uchida, K. Current Status of Acrolein as a Lipid Peroxidation Product. *Trends Cardiovasc. Med.* **1999**, *9* (5), 109–113.
- (91) Esterbauer, H.; Zöllner, H.; Scholz, N. Reaction of Glutathione with Conjugated Carbonyls. *Zeitschrift für Naturforsch. C* **1975**, *30* (7–8), 466–473.
- (92) Ewert, A.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Isotope-Labeling Studies on the Formation Pathway of Acrolein during Heat Processing of Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (33), 8524–8529.
- (93) Endo, Y.; Hayashi, C.; Yamanaka, T.; Takayose, K.; Yamaoka, M.; Tsuno, T.; Nakajima, S. Linolenic Acid as the Main Source of Acrolein Formed During Heating of Vegetable Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90* (7), 959–964.
- (94) Wang, Y.; Cui, P. Reactive Carbonyl Species Derived from Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (28), 6293–6296.
- (95) Stevens, J. F.; Maier, C. S. Acrolein: Sources, Metabolism, and Biomolecular Interactions Relevant to Human Health and Disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52* (1), 7–25.

- (96) Ewert, A.; Granvogl, M.; Schieberle, P. Development of Two Stable Isotope Dilution Assays for the Quantitation of Acrolein in Heat-Processed Fats. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (8), 3582–3589.
- (97) Granvogl, M. Development of Three Stable Isotope Dilution Assays for the Quantitation of (E)-2-Butenal (Crotonaldehyde) in Heat-Processed Edible Fats and Oils as Well as in Food. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (6), 1272–1282.
- (98) Lu, Y.; Lu, M.; Wang, J.; Jiang, X.; Lu, Y.; Qiu, C.; Lv, L.; Dong, W. Inhibitory Activity on the Formation of Reactive Carbonyl Species in Edible Oil by Synthetic Polyphenol Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (32), 9025–9033.
- (99) Spickett, C. M. The Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal: Advances in Chemistry and Analysis. *Redox Biol.* **2013**, *1* (1), 145–152.
- (100) Van Kuijk, F. J. G. M.; Holte, L. L.; Dratz, E. A. 4-Hydroxyhexenal: A Lipid Peroxidation Product Derived from Oxidized Docosahexaenoic Acid. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1990**, *1043* (1), 116–118.
- (101) Zhou, X.; Zhang, Z.; Liu, X.; Wu, D.; Ding, Y.; Li, G.; Wu, Y. Typical Reactive Carbonyl Compounds in Food Products: Formation, Influence on Food Quality, and Detection Methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19* (2), 503–529.
- (102) Pryor, W. A.; Porter, N. A. Suggested Mechanisms for the Production of 4-Hydroxy-2-Nonenal from the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. *Free Radic. Biol. Med.* **1990**, *8* (6), 541–543.
- (103) Schneider, C.; Tallman, K. A.; Porter, N. A.; Brash, A. R. Two Distinct Pathways of Formation of 4-Hydroxynonenal. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (24), 20831–20838.
- (104) Loidl-Stahlhofen, A.; Spiteller, G. α -Hydroxyaldehydes, Products of Lipid Peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1994**, *1211* (2), 156–160.
- (105) Mlakar, A.; Spiteller, G. Previously Unknown Aldehydic Lipid Peroxidation Compounds of Arachidonic Acid. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79* (1), 47–53.
- (106) Mlakar, A.; Spiteller, G. Reinvestigation of Lipid Peroxidation of Linolenic Acid. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1994**, *1214* (2), 209–220.
- (107) Loidl-Stahlhofen, A.; Hannemann, K.; Spiteller, G. Detection of Short-Chain α -Hydroxyaldehydic Compounds as Pentafluorbenzyloxime Derivatives in Bovine Liver. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77* (1), 113–119.
- (108) Jira, W.; Spiteller, G. Plasmalogens and Their Oxidative Degradation Products in Low and High Density Lipoprotein. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79* (2), 95–100.
- (109) Loidl-Stahlhofen, A.; Hannemann, K.; Spiteller, G. Generation of α -Hydroxyaldehydic Compounds in the Course of Lipid Peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1994**, *1213* (2), 140–148.
- (110) Gardner, H. W.; Selke, E. Volatiles from Thermal Decomposition of Isomeric Methyl (12S, 13S)-(E)-12,13-Epoxy-9-Hydroperoxy-10-Octadecenoates. *Lipids* **1984**, *19* (6), 375–380.
- (111) Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Selke, E. Analysis of Autoxidized Fats by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: VII. Volatile Thermal Decomposition Products of Pure Hydroperoxides from Autoxidized and Photosensitized Oxidized Methyl Oleate, Linoleate and Linolenate. *Lipids* **1981**, *16* (5), 279–285.
- (112) Grosch, W. Detection of Potent Odorants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **1993**, *4* (3), 68–73.

- (113) Konopka, U. C.; Grosch, W. Potent Odorants Causing the Warmed-over Flavour in Boiled Beef. *Z Leb. Unters Forch* **1991**, *193* (2), 123–125.
- (114) Lillard, D. A.; Day, E. A. Degradation of Monocarboxyls from Autoxidizing Lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1964**, *41* (8), 549–552.
- (115) Cobb, W. Y.; Day, E. A. Further Observations on the Dicarboxyl Compounds Formed via Autoxidation of Methyl Linoleate. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1965**, *42*, 1110–1112.
- (116) Jiang, Y.; Hengel, M.; Pan, C.; Seiber, J. N.; Shibamoto, T. Determination of Toxic α -Dicarboxyl Compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, Released to the Headspace of Lipid Commodities upon Heat Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (5), 1067–1071.
- (117) Fujioka, K.; Shibamoto, T. Formation of Genotoxic Dicarboxyl Compounds in Dietary Oils upon Oxidation. *Lipids* **2004**, *39* (5), 481–486.
- (118) Fu, M.-X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The Advanced Glycation End Product, N ϵ -(Carboxymethyl)Lysine, Is a Product of Both Lipid Peroxidation and Glycoxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (17), 9982–9986.
- (119) Yu, L.; Chai, M.; Zeng, M.; He, Z.; Chen, J. Effect of Lipid Oxidation on the Formation of N ϵ -Carboxymethyl-Lysine and N ϵ -Carboxyethyl-Lysine in Chinese-Style Sausage during Storage. *Food Chem.* **2018**, *269*, 466–472.
- (120) Lima, M.; Assar, S. H.; Ames, J. M. Formation of N ϵ -(Carboxymethyl)Lysine and Loss of Lysine in Casein Glucose–Fatty Acid Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (3), 1954–1958.
- (121) Miyata, T.; Inagi, R.; Asahi, K.; Yamada, Y.; Horie, K.; Sakai, H.; Uchida, K.; Kurokawa, K. Generation of Protein Carbonyls by Glycoxidation and Lipoxidation Reactions with Autoxidation Products of Ascorbic Acid and Polyunsaturated Fatty Acids. *FEBS Lett.* **1998**, *437* (1–2), 24–28.
- (122) Yu, L.; He, Z.; Zeng, M.; Zheng, Z.; He, J.; Wang, M.; Chen, J. Effects of Oxidised Linoleic Acid on the Formation of N ϵ -Carboxymethyl-Lysine and N ϵ -Carboxyethyl-Lysine in Maillard Reaction System. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2016**, *51* (3), 742–752.
- (123) Liu, X.; Jeffries, H. E.; Sexton, K. G. Atmospheric Photochemical Degradation of 1,4-Unsaturated Dicarboxyls. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33* (23), 4212–4220.
- (124) Onyango, A. N. Small Reactive Carbonyl Compounds as Tissue Lipid Oxidation Products; and the Mechanisms of Their Formation Thereby. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165* (7), 777–786.
- (125) Niyati-Shirkhodae, F.; Shibamoto, T. Gas Chromatographic Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal Formed from Lipids and Related Compounds upon Ultraviolet Irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41* (2), 227–230.
- (126) Ichinose, T.; Nobuyuki, S.; Takano, H.; Abe, M.; Sadakane, K.; Yanagisawa, R.; Ochi, H.; Fujioka, K.; Lee, K.-G.; Shibamoto, T. Liver Carcinogenesis and Formation of 8-Hydroxy-Deoxyguanosine in C3H/HeN Mice by Oxidized Dietary Oils Containing Carcinogenic Dicarboxyl Compounds. *Food Chem. Toxicol.* **2004**, *42* (11), 1795–1803.
- (127) Hirayama, T.; Yamada, N.; Nohara, M.; Fukui, S. The Existence of the 1,2-dicarboxyl Compounds Glyoxal, Methyl Glyoxal and Diacetyl in Autoxidised Edible Oils. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35* (12), 1357–1362.

- (128) Del Rio, D.; Stewart, A. J.; Pellegrini, N. A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2005**, *15* (4), 316–328.
- (129) Golding, B. T.; Patel, N.; Watson, W. P. Dimer and Trimer of Malonaldehyde. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, No. 3, 668.
- (130) Buttkus, H. A. Fluorescent Lipid Autoxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* **1975**, *23* (4), 823–825.
- (131) Pryor, W. A.; Stanley, J. P. Suggested Mechanism for the Production of Malonaldehyde during the Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. Nonenzymic Production of Prostaglandin Endoperoxides during Autoxidation. *J. Org. Chem.* **1975**, *40* (24), 3615–3617.
- (132) Pryor, W. A.; Stanley, J. P.; Blair, E. Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids: II. A Suggested Mechanism for the Formation of TBA-Reactive Materials from Prostaglandin-like Endoperoxides. *Lipids* **1976**, *11* (5), 370–379.
- (133) O'Connor, D. E.; Mihelich, E. D.; Coleman, M. C. Stereochemical Course of the Autooxidative Cyclization of Lipid Hydroperoxides to Prostaglandin-like Bicyclic Endoperoxides. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106* (12), 3577–3584.
- (134) Frankel, E. N.; Neff, W. E. Formation of Malonaldehyde from Lipid Oxidation Products. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1983**, *754* (3), 264–270.
- (135) Quash, G.; Ripoll, H.; Gazzolo, L.; Doutheau, A.; Saba, A.; Gore, J. Malondialdehyde Production from Spermine by Homogenates of Normal and Transformed Cells. *Biochimie* **1987**, *69* (2), 101–108.
- (136) Hecker, M.; Ullrich, V. On the Mechanism of Prostacyclin and Thromboxane A₂ Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (1), 141–150.
- (137) Hamberg, M.; Samuelsson, B. Oxygenation of Unsaturated Fatty Acids by the Vesicular Gland of Sheep. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (22), 5344–5354.
- (138) Fan, X. Ionizing Radiation Induces Formation of Malondialdehyde, Formaldehyde, and Acetaldehyde from Carbohydrates and Organic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (20), 5946–5949.
- (139) Bucknall, T.; Edwards, H. E.; Kemsley, K. G.; Moore, J. S.; Phillips, G. O. The Formation of Malonaldehyde in Irradiated Carbohydrates. *Carbohydr. Res.* **1978**, *62* (1), 49–59.
- (140) Fan, X.; Thayer, D. W. Formation of Malonaldehyde, Formaldehyde, and Acetaldehyde in Apple Juice Induced by Ionizing Radiation. *J. Food Sci.* **2002**, *67* (7), 2523–2528.
- (141) Waravdekar, V. S.; Saslaw, L. D. A Sensitive Colorimetric Method for the Estimation of 2-Deoxy Sugars with the Use of the Malonaldehyde-Thiobarbituric Acid Reaction. *J. Biol. Chem.* **1959**, *234* (8), 1945–1950.
- (142) Cheeseman, K. H.; Beavis, A.; Esterbauer, H. Hydroxyl-Radical-Induced Iron-Catalysed Degradation of 2-Deoxyribose. **1988**, *252* (84035), 649–653.
- (143) Knight, J. A.; Pieper, R. K.; McClellan, L. Specificity of the Thiobarbituric Acid Reaction: Its Use in Studies of Lipid Peroxidation. *Clin. Chem.* **1988**, *34* (12), 2433–2438.
- (144) Kawai, Y.; Fujii, H.; Okada, M.; Tsuchie, Y.; Uchida, K.; Osawa, T. Formation of Nε-(Succinyl)Lysine in Vivo: A Novel Marker for Docosaehaenoic Acid-Derived Protein Modification. *J. Lipid Res.* **2006**, *47* (7), 1386–1398.

- (145) Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H. [42] Determination of Aldehydic Lipid Peroxidation Products: Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal; 1990; pp 407–421.
- (146) Liu, J.; Yeo, H. C.; Doniger, S. J.; Ames, B. N. Assay of Aldehydes from Lipid Peroxidation: Gas Chromatography–Mass Spectrometry Compared to Thiobarbituric Acid. *Anal. Biochem.* **1997**, *245* (2), 161–166.
- (147) Wong, J. W.; Yeo, H. C. H.; Shibamoto, T. Determination of Malonaldehyde and Formaldehyde Formed from Fatty Acid Ethyl Esters upon Microwave and Thermal Heating. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, *39* (12), 2260–2262.
- (148) Raharjo, S.; Sofos, J. N. Methodology for Measuring Malonaldehyde as a Product of Lipid Peroxidation in Muscle Tissues: A Review. *Meat Sci.* **1993**, *35* (2), 145–169.
- (149) Papastergiadis, A.; Mubiru, E.; Van Langenhove, H.; De Meulenaer, B. Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (38), 9589–9594.
- (150) Marcuse, R.; Johansson, L. Studies on the TBA Test for Rancidity Grading: II. TBA Reactivity of Different Aldehyde Classes. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1973**, *50* (10), 387–391.
- (151) Smith, N. L.; Tinsley, I. J.; Bubl, E. C. Some Observations on the Reaction of Glyoxal with 2-Thiobarbituric Acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1960**, *2* (3), 169–173.
- (152) Esterbauer, H.; Cheeseman, K. H.; Dianzani, M. U.; Poli, G.; Slater, T. F. Separation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipid Peroxidation Stimulated by ADP-Fe²⁺ in Rat Liver Microsomes. *Biochem. J.* **1982**, *208* (1), 129–140.
- (153) Witz, G.; Lawrie, N. J.; Zaccaria, A.; Ferran, H. E.; Goldstein, B. D. The Reaction of 2-Thiobarbituric Acid with Biologically Active Alpha, Beta-Unsaturated Aldehydes. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1986**, *2* (1), 33–39.
- (154) Kosugi, H.; Kikugawa, K. Reaction of Thiobarbituric Acid with Saturated Aldehydes. *Lipids* **1986**, *21* (9), 537–542.
- (155) Kosugi, H.; Kato, T.; Kikugawa, K. Formation of Yellow, Orange, and Red Pigments in the Reaction of Alk-2-Enals with 2-Thiobarbituric Acid. *Anal. Biochem.* **1987**, *165* (2), 456–464.
- (156) Kosugi, H.; Kato, T.; Kikugawa, K. Formation of Red Pigment by a Two-Step 2-Thiobarbituric Acid Reaction of Alka-2,4-Dienals. Potential Products of Lipid Oxidation. *Lipids* **1988**, *23* (11), 1024–1031.
- (157) Bird, R. P.; Hung, S. S. O.; Hadley, M.; Draper, H. H. Determination of Malonaldehyde in Biological Materials by High-Pressure Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* **1983**, *128* (1), 240–244.
- (158) de las Heras, A.; Schoch, A.; Gibis, M.; Fischer, A. Comparison of Methods for Determining Malondialdehyde in Dry Sausage by HPLC and the Classic TBA Test. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *217* (2), 180–184.
- (159) Draper, H. H.; Squires, E. J.; Mahmoodi, H.; Wu, J.; Agarwal, S.; Hadley, M. A Comparative Evaluation of Thiobarbituric Acid Methods for the Determination of Malondialdehyde in Biological Materials. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, *15* (4), 353–363.

- (160) Bertolín, J. R.; Joy, M.; Blanco, M. Malondialdehyde Determination in Raw and Processed Meat Products by UPLC-DAD and UPLC-FLD. *Food Chem.* **2019**, *298*, 125009.
- (161) Mendonça, R.; Gning, O.; Di Cesaré, C.; Lachat, L.; Bennett, N. C.; Helfenstein, F.; Glauser, G. Sensitive and Selective Quantification of Free and Total Malondialdehyde in Plasma Using UHPLC-HRMS. *J. Lipid Res.* **2017**, *58* (9), 1924–1931.
- (162) Mao, J.; Zhang, H.; Luo, J.; Li, L.; Zhao, R.; Zhang, R.; Liu, G. New Method for HPLC Separation and Fluorescence Detection of Malonaldehyde in Normal Human Plasma. *J. Chromatogr. B* **2006**, *832* (1), 103–108.
- (163) Steghens, J.-P.; van Kappel, A. L.; Denis, I.; Collombel, C. Diaminonaphtalene, a New Highly Specific Regent for HPLC-UV Measurement of Total and Free Malondialdehyde in Human Plasma or Serum. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31* (2), 242–249.
- (164) Cighetti, G.; Debiassi, S.; Paroni, R.; Allevi, P. Free and Total Malondialdehyde Assessment in Biological Matrices by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: What Is Needed for an Accurate Detection. *Anal. Biochem.* **1999**, *266* (2), 222–229.
- (165) De Vecchi, A. F.; Bamonti, F.; Novembrino, C.; Ippolito, S.; Guerra, L.; Lonati, S.; Salini, S.; Aman, C. S.; Scurati-Manzoni, E.; Cighetti, G. Free and Total Plasma Malondialdehyde in Chronic Renal Insufficiency and in Dialysis Patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24* (8), 2524–2529.
- (166) Carbonneau, M. A.; Peuchant, E.; Sess, D.; Canioni, P.; Clerc, M. Free and Bound Malondialdehyde Measured as Thiobarbituric Acid Adduct by HPLC in Serum and Plasma. *Clin. Chem.* **1991**, *37* (8), 1423–1429.
- (167) Hong, Y.-L.; Yeh, S.-L.; Chang, C.-Y.; Hu, M.-L. Total Plasma Malondialdehyde Levels in 16 Taiwanese College Students Determined by Various Thiobarbituric Acid Tests and an Improved High-Performance Liquid Chromatography-Based Method. *Clin. Biochem.* **2000**, *33* (8), 619–625.
- (168) Pilz, J.; Meineke, I.; Gleiter, C. H. Measurement of Free and Bound Malondialdehyde in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography as the 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *742* (2), 315–325.
- (169) Shin, H.-S.; Jung, D.-G. Sensitive Analysis of Malondialdehyde in Human Urine by Derivatization with Pentafluorophenylhydrazine Then Headspace GC–MS. *Chromatographia* **2009**, *70*, 899–903.
- (170) Tomita, M.; Okuyama, T.; Hatta, Y.; Kawai, S. Determination of Free Malonaldehyde by Gas Chromatography with an Electron-Capture Detector. *J. Chromatogr. B* **1990**, *526*, 174–179.
- (171) Sangalli, L.; Chiesa, L. M.; Passerò, E.; Manzocchi, A.; Maffeo, G.; Biondi, P. A. Improved Procedure for the Determination of Malonaldehyde by Gas-Chromatography with Electron-Capture Detection as 2,4,6-Trichlorophenylhydrazine Derivative. *J. Chromatogr. B* **2003**, *796* (1), 201–207.
- (172) Beljean-Leymarie, M.; Bruna, E. Subpicogram Determination of Malondialdehyde by Gas-Liquid Chromatography with Nitrogen Phosphorus Detector. *Anal. Biochem.* **1988**, *173* (1), 174–184.

- (173) De Zwart, L. L.; Venhorst, J.; Groot, M.; Commandeur, J. N. .; Hermanns, R. C. .; Meerman, J. H. .; Van Baar, B. L. .; Vermeulen, N. P. . Simultaneous Determination of Eight Lipid Peroxidation Degradation Products in Urine of Rats Treated with Carbon Tetrachloride Using Gas Chromatography with Electron-Capture Detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1997**, *694* (2), 277–287.
- (174) Tsikas, D.; Rothmann, S.; Schneider, J. Y.; Suchy, M.-T.; Trettin, A.; Modun, D.; Stuke, N.; Maassen, N.; Frölich, J. C. Development, Validation and Biomedical Applications of Stable-Isotope Dilution GC–MS and GC–MS/MS Techniques for Circulating Malondialdehyde (MDA) after Pentafluorobenzyl Bromide Derivatization: MDA as a Biomarker of Oxidative Stress and Its Relation to 1. *J. Chromatogr. B* **2016**, *1019*, 95–111.
- (175) Agarwal, R.; Chase, S. Rapid, Fluorimetric–Liquid Chromatographic Determination of Malondialdehyde in Biological Samples. *J. Chromatogr. B* **2002**, *775* (1), 121–126.
- (176) Sim, A. S.; Salonikas, C.; Naidoo, D.; Wilcken, D. E. L. Improved Method for Plasma Malondialdehyde Measurement by High-Performance Liquid Chromatography Using Methyl Malondialdehyde as an Internal Standard. *J. Chromatogr. B* **2003**, *785* (2), 337–344.
- (177) Papastergiadis, A.; Fatouh, A.; Jacxsens, L.; Lachat, C.; Shrestha, K.; Daelman, J.; Kolsteren, P.; Van Langenhove, H.; De Meulenaer, B. Exposure Assessment of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal and 4-Hydroxy-2-(E)-Hexenal through Specific Foods Available in Belgium. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *73*, 51–58.
- (178) Globisch, M.; Kaden, D.; Henle, T. 4-Hydroxy-2-Nonenal (4-HNE) and Its Lipation Product 2-Pentylpyrrole Lysine (2-PPL) in Peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (21), 5273–5281.
- (179) Douny, C.; Tihon, A.; Bayonnet, P.; Brose, F.; Degand, G.; Rozet, E.; Milet, J.; Ribonnet, L.; Lambin, L.; Larondelle, Y.; Scippo, M.-L. Validation of the Analytical Procedure for the Determination of Malondialdehyde and Three Other Aldehydes in Vegetable Oil Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) and Application to Linseed Oil. *Food Anal. Methods* **2015**, *8* (6), 1425–1435.
- (180) Ma, L.; Liu, G. Simultaneous Analysis of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-Hexenal, and 4-Hydroxy-2-Nonenal in Vegetable Oil by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (51), 11320–11328.
- (181) Wang, Y.; Ho, C.-T. Flavour Chemistry of Methylglyoxal and Glyoxal. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (11), 4140.
- (182) Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Strecker-Type Degradation Produced by the Lipid Oxidation Products 4,5-Epoxy-2-Alkenals. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52* (23), 7126–7131.
- (183) Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Interplay between the Maillard Reaction and Lipid Peroxidation in Biochemical Systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043* (1), 319–326.
- (184) Baldensperger, T.; Glomb, M. A. Pathways of Non-Enzymatic Lysine Acylation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 1–9.

- (185) Davídek, T.; Robert, F.; Devaud, S.; Vera, F. A.; Blank, I.; Saale, H. Sugar Fragmentation in the Maillard Reaction Cascade: Formation of Short-Chain Carboxylic Acids by a New Oxidative α -Dicarbonyl Cleavage Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (18), 6677–6684.
- (186) Davídek, T.; Devaud, S.; Robert, F.; Blank, I. Sugar Fragmentation in the Maillard Reaction Cascade: Isotope Labeling Studies on the Formation of Acetic Acid by a Hydrolytic β -Dicarbonyl Cleavage Mechanism. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (18), 6667–6676.
- (187) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (18), 4887–4891.
- (188) Ahmed, M. U.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Identification of N Epsilon-Carboxymethyllysine as a Degradation Product of Fructoselysine in Glycated Protein. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (11), 4889–4894.
- (189) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (17), 10017–10026.
- (190) Krause, R.; Knoll, K.; Henle, T. Studies on the Formation of Furosine and Pyridosine during Acid Hydrolysis of Different Amadori Products of Lysine. *Eur. Food Res. Technol.* **2003**, *216* (4), 277–283.
- (191) Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, *51* (5), 786–794.
- (192) Strahl, B. D.; Allis, C. D. The Language of Covalent Histone Modifications. *Nature* **2000**, *403* (6765), 41–45.
- (193) Marmorstein, R.; Zhou, M.-M. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6* (7), a018762.
- (194) Wang, Z. A.; Cole, P. A. The Chemical Biology of Reversible Lysine Post-Translational Modifications. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (8), 953–969.
- (195) Simic, Z.; Weiwad, M.; Schierhorn, A.; Steegborn, C.; Schutkowski, M. The ϵ -Amino Group of Protein Lysine Residues Is Highly Susceptible to Nonenzymatic Acylation by Several Physiological Acyl-CoA Thioesters. *ChemBioChem* **2015**, *16* (16), 2337–2347.
- (196) Wagner, G. R.; Payne, R. M. Widespread and Enzyme-Independent N ϵ -Acetylation and N ϵ -Succinylation of Proteins in the Chemical Conditions of the Mitochondrial Matrix. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (40), 29036–29045.
- (197) Simithy, J.; Sidoli, S.; Yuan, Z.-F.; Coradin, M.; Bhanu, N. V.; Marchione, D. M.; Klein, B. J.; Bazilevsky, G. A.; McCullough, C. E.; Magin, R. S.; Kutateladze, T. G.; Snyder, N. W.; Marmorstein, R.; Garcia, B. A. Characterization of Histone Acylations Links Chromatin Modifications with Metabolism. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 1141.
- (198) Wagner, G. R.; Bhatt, D. P.; O'Connell, T. M.; Thompson, J. W.; Dubois, L. G.; Backos, D. S.; Yang, H.; Mitchell, G. A.; Ilkayeva, O. R.; Stevens, R. D.; Grimsrud, P. A.; Hirschey, M. D. A Class of Reactive Acyl-CoA Species Reveals the Non-Enzymatic Origins of Protein Acylation. *Cell Metab.* **2017**, *25* (4), 823–837.

- (199) He, W.; Newman, J. C.; Wang, M. Z.; Ho, L.; Verdin, E. Mitochondrial Sirtuins: Regulators of Protein Acylation and Metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23* (9), 467–476.
- (200) James, A. M.; Hoogewijs, K.; Logan, A.; Hall, A. R.; Ding, S.; Fearnley, I. M.; Murphy, M. P. Non-Enzymatic N-Acetylation of Lysine Residues by AcetylCoA Often Occurs via a Proximal S-Acetylated Thiol Intermediate Sensitive to Glyoxalase II. *Cell Rep.* **2017**, *18* (9), 2105–2112.
- (201) Ramponi, G.; Manao, G.; Camici, G. Nonenzymic Acetylation of Histones with Acetyl Phosphate and Acetyl Adenylate. *Biochemistry* **1975**, *14* (12), 2681–2685.
- (202) Weinert, B. T.; Iesmantavicius, V.; Wagner, S. A.; Schölz, C.; Gummesson, B.; Beli, P.; Nyström, T.; Choudhary, C. Acetyl-Phosphate Is a Critical Determinant of Lysine Acetylation in E. Coli. *Mol. Cell* **2013**, *51* (2), 265–272.
- (203) Baldensperger, T.; Sanzo, S. Di; Ori, A.; Glomb, M. A. Quantitation of Reactive Acyl-CoA Species Mediated Protein Acylation by HPLC–MS/MS. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (19), 12336–12343.
- (204) Houtkooper, R. H.; Pirinen, E.; Auwerx, J. Sirtuins as Regulators of Metabolism and Healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13* (4), 225–238.
- (205) Lombard, D. B.; Alt, F. W.; Cheng, H.-L. H.-L.; Bunkenborg, J.; Streeper, R. S.; Mostoslavsky, R.; Kim, J.; Yancopoulos, G.; Valenzuela, D.; Murphy, A.; Yang, Y.; Chen, Y.; Hirschey, M. D.; Bronson, R. T.; Haigis, M.; Guarente, L. P.; Farese, R. V.; Weissman, S.; Verdin, E.; Schwer, B. Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, *27* (24), 8807–8814.
- (206) Park, J.; Chen, Y.; Tishkoff, D. X.; Peng, C.; Tan, M.; Dai, L.; Xie, Z.; Zhang, Y.; Zwaans, B. M. M.; Skinner, M. E.; Lombard, D. B.; Zhao, Y. SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways. *Mol. Cell* **2013**, *50* (6), 919–930.
- (207) Tan, M.; Peng, C.; Anderson, K. A.; Chhoy, P.; Xie, Z.; Dai, L.; Park, J.; Chen, Y.; Huang, H.; Zhang, Y.; Ro, J.; Wagner, G. R.; Green, M. F.; Madsen, A. S.; Schmiesing, J.; Peterson, B. S.; Xu, G.; Ilkayeva, O. R.; Muehlbauer, M. J.; Braulke, T.; Mühlhausen, C.; Backos, D. S.; Olsen, C. A.; McGuire, P. J.; Pletcher, S. D.; Lombard, D. B.; Hirschey, M. D.; Zhao, Y. Lysine Glutarylation Is a Protein Posttranslational Modification Regulated by SIRT5. *Cell Metab.* **2014**, *19* (4), 605–617.
- (208) Moreno-Yruela, C.; Zhang, D.; Wei, W.; Bæk, M.; Liu, W.; Gao, J.; Danková, D.; Nielsen, A. L.; Bolding, J. E.; Yang, L.; Jameson, S. T.; Wong, J.; Olsen, C. A.; Zhao, Y. Class I Histone Deacetylases (HDAC1–3) Are Histone Lysine Delactylases. *Sci. Adv.* **2022**, *8* (3).
- (209) Zessin, M.; Meleshin, M.; Praetorius, L.; Sippl, W.; Bařinka, C.; Schutkowski, M. Uncovering Robust Delactylase and Depyruvylase Activities of HDAC Isoforms. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17* (6), 1364–1375.
- (210) Dai, Z.; Nemet, I.; Shen, W.; Monnier, V. M. Isolation, Purification and Characterization of Histidino-Threosidine, a Novel Maillard Reaction Protein Crosslink from Threose, Lysine and Histidine. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *463* (1), 78–88.

- (211) Gensberger-Reigl, S.; Atzenbeck, L.; Göttler, A.; Pischetsrieder, M. Identification of [6-Hydroxy-2-(Hydroxymethyl)-5-Oxo-5,6-Dihydro-2 H -Pyran-3-Yl]-Cysteine (HHPC) as a Cysteine-Specific Modification Formed from 3,4-Dideoxyglucosone-3-Ene (3,4-DGE). *Chem. Res. Toxicol.* **2019**, *32* (2), 304–311.
- (212) Zeng, J.; Davies, M. J. Evidence for the Formation of Adducts and S-(Carboxymethyl)Cysteine on Reaction of α -Dicarbonyl Compounds with Thiol Groups on Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18* (8), 1232–1241.
- (213) Lund, M. N.; Ray, C. A. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (23), 4537–4552.
- (214) Aldini, G.; Dalle-Donne, I.; Facino, R. M.; Milzani, A.; Carini, M. Intervention Strategies to Inhibit Protein Carbonylation by Lipoxidation-Derived Reactive Carbonyls. *Med. Res. Rev.* **2007**, *27* (6), 817–868.
- (215) Peng, X.; Ma, J.; Chen, F.; Wang, M. Naturally Occurring Inhibitors against the Formation of Advanced Glycation End-Products. *Food Funct.* **2011**, *2* (6), 289.
- (216) Löbner, J.; Degen, J.; Henle, T. Creatine Is a Scavenger for Methylglyoxal under Physiological Conditions via Formation of N-(4-Methyl-5-Oxo-1-Imidazolyl)Sarcosine (MG-HCr). *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (8), 2249–2256.
- (217) Treibmann, S.; Spengler, F.; Degen, J.; Löbner, J.; Henle, T. Studies on the Formation of 3-Deoxyglucosone- and Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolones of Creatine during Heat Treatment of Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (20), 5874–5881.
- (218) Alt, N.; Schieberle, P. Model Studies on the Influence of High Hydrostatic Pressure on the Formation of Glycated Arginine Modifications at Elevated Temperatures. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (14), 5789–5797.
- (219) Alt, N.; Schieberle, P. Identification of N⁷-(1-Carboxyethyl)-Arginine, a Novel Posttranslational Protein Modification of Arginine Formed at High Hydrostatic Pressure. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2005**, *1043* (1), 55–58.
- (220) Oya, T.; Hattori, N.; Mizuno, Y.; Miyata, S.; Maeda, S.; Osawa, T.; Uchida, K. Methylglyoxal Modification of Protein. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (26), 18492–18502.
- (221) Shipanova, I. N.; Glomb, M. A.; Nagaraj, R. H. Protein Modification by Methylglyoxal: Chemical Nature and Synthetic Mechanism of a Major Fluorescent Adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *344* (1), 29–36.
- (222) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes: Characterization and Detection of Lysine–Arginine Cross-Links Derived from Glyoxal and Methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (11), 2499–2507.
- (223) Wells-Knecht, K. J.; Brinkmann, E.; Baynes, J. W. Characterization of an Imidazolium Salt Formed from Glyoxal and N α -Hippuryllysine: A Model for Maillard Reaction Crosslinks in Proteins. *J. Org. Chem.* **1995**, *60* (20), 6246–6247.
- (224) Brinkmann, E.; Wells-Knecht, K. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Characterization of an Imidazolium Compound Formed by Reaction of Methylglyoxal and N α -Hippuryllysine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, No. 22, 2817–2818.
- (225) Niwa, T.; Katsuzaki, T.; Ishizaki, Y.; Hayase, F.; Miyazaki, T.; Uematsu, T.; Tatemichi, N.; Takei, Y. Imidazolone, a Novel Advanced Glycation End Product, Is Present at High Levels in Kidneys of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *FEBS Lett.* **1997**, *407* (3), 297–302.

- (226) Biemel, K. M.; Reihl, O.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Formation Pathways for Lysine-Arginine Cross-Links Derived from Hexoses and Pentoses by Maillard Processes. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (26), 23405–23412.
- (227) Skovsted, I. C.; Christensen, M.; Breinholt, J.; Mortensen, S. B. Characterisation of a Novel AGE-Compound Derived from Lysine and 3-Deoxyglucosone. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **1998**, 44 (7), 1159–1163.
- (228) Reihl, O.; Lederer, M. O.; Schwack, W. Characterization and Detection of Lysine–Arginine Cross-Links Derived from Dehydroascorbic Acid. *Carbohydr. Res.* **2004**, 339 (3), 483–491.
- (229) Reihl, O.; Biemel, K. M.; Eipper, W.; Lederer, M. O.; Schwack, W. Spiro Cross-Links: Representatives of a New Class of Glycoxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (16), 4810–4818.
- (230) Biemel, K. M.; Friedl, D. A.; Lederer, M. O. Identification and Quantification of Major Maillard Cross-Links in Human Serum Albumin and Lens Protein. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (28), 24907–24915.
- (231) Kuster, B. F. M. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF). A Review Focussing on Its Manufacture. *Starch - Stärke* **1990**, 42 (8), 314–321.
- (232) Kus, S.; Gogus, F.; Eren, S. Hydroxymethyl Furfural Content of Concentrated Food Products. *Int. J. Food Prop.* **2005**, 8 (2), 367–375.
- (233) Hellwig, M.; Henle, T. Formylone, a New Glycation Compound from the Reaction of Lysine and 3-Deoxypentose. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, 230 (6), 903–914.
- (234) Nagaraj, R. H.; Portero-Otin, M.; Monnier, V. M. Pyrraline Ether Crosslinks as a Basis for Protein Crosslinking by the Advanced Maillard Reaction in Aging and Diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 325 (2), 152–158.
- (235) Monnier, V. M.; Sun, W.; Sell, D. R.; Fan, X.; Nemet, I.; Genuth, S. Glucosepane: A Poorly Understood Advanced Glycation End Product of Growing Importance for Diabetes and Its Complications. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2014**, 52 (1).
- (236) Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes—Characterization and Detection of a Lysine-Arginine Cross-Link Derived from d-Glucose. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7 (6), 1081–1088.
- (237) Nagaraj, R. H.; Monnier, V. M. Isolation and Characterization of a Blue Fluorophore from Human Eye Lens Crystallins: In Vitro Formation from Maillard Reaction with Ascorbate and Ribose. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1992**, 1116 (1), 34–42.
- (238) Tessier, F.; Obrenovich, M.; Monnier, V. M. Structure and Mechanism of Formation of Human Lens Fluorophore LM-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (30), 20796–20804.
- (239) Nakamura, K.; Nakazawa, Y.; Ienaga, K. Acid-Stable Fluorescent Advanced Glycation End Products: Vesperlysines A, B, and C Are Formed as Crosslinked Products in the Maillard Reaction between Lysine or Proteins with Glucose. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 232 (1), 227–230.
- (240) Kato, Y.; Osawa, T. Detection of Lipid-Lysine Amide-Type Adduct as a Marker of PUFA Oxidation and Its Applications. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, 501 (2), 182–187.

- (241) Kato, Y.; Mori, Y.; Makino, Y.; Morimitsu, Y.; Hiroi, S.; Ishikawa, T.; Osawa, T. Formation of N ϵ -(Hexanonyl)Lysine in Protein Exposed to Lipid Hydroperoxide. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274 (29), 20406–20414.
- (242) Ishino, K.; Shibata, T.; Ishii, T.; Liu, Y.-T.; Toyokuni, S.; Zhu, X.; Sayre, L. M.; Uchida, K. Protein N-Acylation: H₂O₂-Mediated Covalent Modification of Protein by Lipid Peroxidation-Derived Saturated Aldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21 (6), 1261–1270.
- (243) Onorato, J. M.; Jenkins, A. J.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine, an Inhibitor of Advanced Glycation Reactions, Also Inhibits Advanced Lipoxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275 (28), 21177–21184.
- (244) Metz, T. O.; Alderson, N. L.; Chachich, M. E.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Pyridoxamine Traps Intermediates in Lipid Peroxidation Reactions in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (43), 42012–42019.
- (245) Kawai, Y.; Kato, Y.; Fujii, H.; Makino, Y.; Mori, Y.; Naito, M.; Osawa, T. Immunochemical Detection of a Novel Lysine Adduct Using an Antibody to Linoleic Acid Hydroperoxide-Modified Protein. *J. Lipid Res.* **2003**, 44 (6), 1124–1131.
- (246) Tsuji, K.; Kawai, Y.; Kato, Y.; Osawa, T. Formation of N-(Hexanoyl)Ethanolamine, a Novel Phosphatidylethanolamine Adduct, during the Oxidation of Erythrocyte Membrane and Low-Density Lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 306 (3), 706–711.
- (247) Hisaka, S.; Kato, Y.; Kitamoto, N.; Yoshida, A.; Kubushiro, Y.; Naito, M.; Osawa, T. Chemical and Immunochemical Identification of Propanoyllysine Derived from Oxidized N-3 Polyunsaturated Fatty Acid. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 46 (11), 1463–1471.
- (248) Tyihák, E.; Trézl, L.; Kolonits, P. The Isolation of N ϵ -Formyl-L-Lysine from the Reaction between Formaldehyde and L-Lysine and Its Identification by OPLC and NMR Spectroscopy. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1985**, 3 (4), 343–349.
- (249) Edrissi, B.; Taghizadeh, K.; Dedon, P. C. Quantitative Analysis of Histone Modifications: Formaldehyde Is a Source of Pathological N₆-Formyllysine That Is Refractory to Histone Deacetylases. *PLoS Genet.* **2013**, 9 (2), e1003328.
- (250) Edrissi, B.; Taghizadeh, K.; Moeller, B. C.; Kracko, D.; Doyle-Eisele, M.; Swenberg, J. A.; Dedon, P. C. Dosimetry of N₆-Formyllysine Adducts Following [¹³C₂H₂]-Formaldehyde Exposures in Rats. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26 (10), 1421–1423.
- (251) Edrissi, B.; Taghizadeh, K.; Moeller, B. C.; Yu, R.; Kracko, D.; Doyle-Eisele, M.; Swenberg, J. A.; Dedon, P. C. N₆-Formyllysine as a Biomarker of Formaldehyde Exposure: Formation and Loss of N₆-Formyllysine in Nasal Epithelium in Long-Term, Low-Dose Inhalation Studies in Rats. *Chem. Res. Toxicol.* **2017**, 30 (8), 1572–1576.
- (252) Martin-Rubio, A. S.; Sopelana, P.; Nakashima, F.; Shibata, T.; Uchida, K.; Guillén, M. D. A Dual Perspective of the Action of Lysine on Soybean Oil Oxidation Process Obtained by Combining ¹H NMR and LC–MS: Antioxidant Effect and Generation of Lysine–Aldehyde Adducts. *Antioxidants* **2019**, 8 (9), 326.
- (253) Utrera, M.; Rodríguez-Carpena, J.-G.; Morcuende, D.; Estévez, M. Formation of Lysine-Derived Oxidation Products and Loss of Tryptophan during Processing of Porcine Patties with Added Avocado Byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60 (15), 3917–3926.

- (254) Kato, Y.; Yoshida, A.; Naito, M.; Kawai, Y.; Tsuji, K.; Kitamura, M.; Kitamoto, N.; Osawa, T. Identification and Quantification of N ϵ -(Hexanoyl)Lysine in Human Urine by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *37* (11), 1864–1874.
- (255) Garrity, J.; Gardner, J. G.; Hawse, W.; Wolberger, C.; Escalante-Semerena, J. C. N-Lysine Propionylation Controls the Activity of Propionyl-CoA Synthetase. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (41), 30239–30245.
- (256) Nair, V.; Vietti, D. E.; Cooper, C. S. Degenerative Chemistry of Malondialdehyde. Structure, Stereochemistry, and Kinetics of Formation of Enaminals from Reaction with Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (11), 3030–3036.
- (257) Nair, V.; Cooper, C. S.; Vietti, D. E.; Turner, G. A. The Chemistry of Lipid Peroxidation Metabolites: Crosslinking Reactions of Malondialdehyde. *Lipids* **1986**, *21* (1), 6–10.
- (258) Itakura, K.; Uchida, K. Evidence That Malondialdehyde-Derived Aminoenimine Is Not a Fluorescent Age Pigment. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (5), 473–475.
- (259) Chio, K. S.; Tappel, A. L. Inactivation of Ribonuclease and Other Enzymes by Peroxidizing Lipids and by Malonaldehyde. *Biochemistry* **1969**, *8* (7), 2827–2832.
- (260) Nair, V.; Offerman, R. J.; Turner, G. A. Novel Fluorescent 1,4-Dihydropyridines. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (26), 8283–8285.
- (261) Nair, V.; Offerman, R. J.; Turner, G. A.; Pryor, A. N.; Baenzlger, N. C. Fluorescent 1,4-Dihydropyridines: The Malondialdehyde Connection. *Tetrahedron* **1988**, *44* (10), 2793–2803.
- (262) Slatter, D. A.; Murray, M.; Bailey, A. J. Formation of a Dihydropyridine Derivative as a Potential Cross-Link Derived from Malondialdehyde in Physiological Systems. *FEBS Lett.* **1998**, *421* (3), 180–184.
- (263) Zagol-Ikapite, I.; Sosa, I. R.; Oram, D.; Judd, A.; Amarnath, K.; Amarnath, V.; Stec, D.; Oates, J. A.; Boutaud, O. Modification of Platelet Proteins by Malondialdehyde: Prevention by Dicarboxyl Scavengers. *J. Lipid Res.* **2015**, *56* (11), 2196–2205.
- (264) Choudhury, L. H.; Parvin, T. Recent Advances in the Chemistry of Imine-Based Multicomponent Reactions (MCRs). *Tetrahedron* **2011**, *67* (43), 8213–8228.
- (265) Uchida, K.; Sakai, K.; Itakura, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S. Protein Modification by Lipid Peroxidation Products: Formation of Malondialdehyde-Derived N ϵ -(2-Propenal)Lysine in Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *346* (1), 45–52.
- (266) Ishii, T.; Kumazawa, S.; Sakurai, T.; Nakayama, T.; Uchida, K. Mass Spectroscopic Characterization of Protein Modification by Malondialdehyde. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19* (1), 122–129.
- (267) Gürbüz, G.; Heinonen, M. LC–MS Investigations on Interactions between Isolated β -Lactoglobulin Peptides and Lipid Oxidation Product Malondialdehyde. *Food Chem.* **2015**, *175*, 300–305.
- (268) Zhao, J.; Chen, J.; Zhu, H.; Xiong, Y. L. Mass Spectrometric Evidence of Malonaldehyde and 4-Hydroxynonenal Adductions to Radical-Scavenging Soy Peptides. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (38), 9727–9736.
- (269) Ishii, T.; Ito, S.; Kumazawa, S.; Sakurai, T.; Yamaguchi, S.; Mori, T.; Nakayama, T.; Uchida, K. Site-Specific Modification of Positively-Charged Surfaces on Human Serum Albumin by Malondialdehyde. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *371* (1), 28–32.

- (270) Foettinger, A.; Melmer, M.; Leitner, A.; Lindner, W. Reaction of the Indole Group with Malondialdehyde: Application for the Derivatization of Tryptophan Residues in Peptides. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18* (5), 1678–1683.
- (271) Shuck, S. C.; Wauchope, O. R.; Rose, K. L.; Kingsley, P. J.; Rouzer, C. A.; Shell, S. M.; Sugitani, N.; Chazin, W. J.; Zagol-Ikapitte, I.; Boutaud, O.; Oates, J. A.; Galligan, J. J.; Beavers, W. N.; Marnett, L. J. Protein Modification by Adenine Propenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (10), 1732–1742.
- (272) King, T. P. Selective Chemical Modification of Arginyl Residues. *Biochemistry* **1966**, *5* (11), 3454–3459.
- (273) Kishida, E.; Oribe, M.; Mochizuki, K.; Kojo, S.; Iguchi, H. Determination of Malondialdehyde with Chemical Derivatization into the Pyrimidine Compound and HPLC. *Biochim. Biophys. Acta - Lipids Lipid Metab.* **1990**, *1045* (2), 187–188.
- (274) Foettinger, A.; Leitner, A.; Lindner, W. Derivatisation of Arginine Residues with Malondialdehyde for the Analysis of Peptides and Protein Digests by LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (5), 623–632.
- (275) Leitner, A.; Foettinger, A.; Lindner, W. Improving Fragmentation of Poorly Fragmenting Peptides and Phosphopeptides during Collision-Induced Dissociation by Malondialdehyde Modification of Arginine Residues. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42* (7), 950–959.
- (276) Slatter, D. A.; Paul, R. G.; Murray, M.; Bailey, A. J. Reactions of Lipid-Derived Malondialdehyde with Collagen. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (28), 19661–19669.
- (277) Slatter, D. A.; Avery, N. C.; Bailey, A. J. Identification of a New Cross-Link and Unique Histidine Adduct from Bovine Serum Albumin Incubated with Malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (1), 61–69.
- (278) Piche, L. A.; Cole, P. D.; Hadley, M.; Van Den Bergh, R.; Draper, H. H. Identification of N-ε-(2-Propenal)Lysine as the Main Form of Malondialdehyde in Food Digesta. *Carcinogenesis* **1988**, *9* (3), 473–477.
- (279) Draper, H. H.; Hadley, M.; Lissemore, L.; Laing, N. M.; Cole, P. D. Identification of N-ε-(2-Propenal)Lysine as a Major Urinary Metabolite of Malondialdehyde. *Lipids* **1988**, *23* (6), 626–628.
- (280) Girón-Calle, J.; Alaiz, M.; Millán, F.; Ruiz-Gutiérrez, V.; Vioque, E. Bound Malondialdehyde in Foods: Bioavailability of the N-2-Propenals of Lysine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (21), 6194–6198.
- (281) McGirr, L. G.; Hadley, M.; Draper, H. H. Identification of Nα-Acetyl-ε-(2-Propenal)Lysine as a Urinary Metabolite of Malondialdehyde. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260* (29), 15427–15431.
- (282) Hadley, M.; Draper, H. H. Identification of N-(2-Propenal)Ethanolamine as a Urinary Metabolite of Malondialdehyde. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *6* (1), 49–52.
- (283) Hadley, M.; Draper, H. H. Identification of N-(2-propenal) Serine as a Urinary Metabolite of Malondialdehyde. *FASEB J.* **1988**, *2* (2), 138–140.
- (284) Girón, J.; Alaiz, M.; Vioque, E. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of n-ε-(2-Propenal)Lysine in Biological Samples after Derivatization with Diethylethoxymethylenemalonate. *Anal. Biochem.* **1992**, *206* (1), 155–160.

- (285) Requena, J. R.; Fu, M. X.; Ahmed, M. U.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Quantification of Malondialdehyde and 4-Hydroxynonenal Adducts to Lysine Residues in Native and Oxidized Human Low-Density Lipoprotein. *Biochem. J.* **1997**, 322 (1), 317–325.
- (286) Miyata, T.; Fu, M. X.; Kurokawa, K.; Van Ypersele De Strihou, C.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Autoxidation Products of Both Carbohydrates and Lipids Are Increased in Uremic Plasma: Is There Oxidative Stress in Uremia? *Kidney Int.* **1998**, 54 (4), 1290–1295.
- (287) Pradas, I.; Jové, M.; Cabré, R.; Ayala, V.; Mota-Martorell, N.; Pamplona, R. Effects of Aging and Methionine Restriction on Rat Kidney Metabolome. *Metabolites* **2019**, 9 (11), 280.
- (288) Sanz, A.; Gredilla, R.; Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Vara, E.; Tresguerres, J. A. F.; Barja, G. Effect of Insulin and Growth Hormone on Rat Heart and Liver Oxidative Stress in Control and Caloric Restricted Animals. *Biogerontology* **2005**, 6 (1), 15–26.
- (289) Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Bellmunt, M. J.; Gredilla, R.; Barja, G. Aging Increases N Epsilon-(Carboxymethyl)Lysine and Caloric Restriction Decreases N Epsilon-(Carboxyethyl)Lysine and N Epsilon-(Malondialdehyde)Lysine in Rat Heart Mitochondrial Proteins. *Free Radic. Res.* **2002**, 36 (1), 47–54.
- (290) Lambert, A. J.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Merry, B. J. Effect of Ageing and Caloric Restriction on Specific Markers of Protein Oxidative Damage and Membrane Peroxidizability in Rat Liver Mitochondria. *Mech. Ageing Dev.* **2004**, 125 (8), 529–538.
- (291) Ruiz, M. C.; Ayala, V.; Portero-Otín, M.; Requena, J. R.; Barja, G.; Pamplona, R. Protein Methionine Content and MDA-Lysine Adducts Are Inversely Related to Maximum Life Span in the Heart of Mammals. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, 126 (10), 1106–1114.
- (292) Portero-Otín, M.; Requena, J. R.; Bellmunt, M. J.; Ayala, V.; Pamplona, R. Protein Nonenzymatic Modifications and Proteasome Activity in Skeletal Muscle from the Short-Lived Rat and Long-Lived Pigeon. *Exp. Gerontol.* **2004**, 39 (10), 1527–1535.
- (293) Pamplona, R.; Portero-Otín, M.; Sanz, A.; Ayala, V.; Vasileva, E.; Barja, G. Protein and Lipid Oxidative Damage and Complex I Content Are Lower in the Brain of Budgerigar and Canaries than in Mice. Relation to Aging Rate. *Age (Omaha)*. **2005**, 27 (4), 267–280.
- (294) Nadkarni, D. V.; Sayre, L. M. Structural Definition of Early Lysine and Histidine Adduction Chemistry of 4-Hydroxynonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8 (2), 284–291.
- (295) Esterbauer, H.; Ertl, A.; Scholz, N. The Reaction of Cysteine with α,β -Unsaturated Aldehydes. *Tetrahedron* **1976**, 32 (2), 285–289.
- (296) Uchida, K.; Stadtman, E. R. Modification of Histidine Residues in Proteins by Reaction with 4-Hydroxynonenal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, 89 (10), 4544–4548.
- (297) Doorn, J. A.; Petersen, D. R. Covalent Adduction of Nucleophilic Amino Acids by 4-Hydroxynonenal and 4-Oxononenal. *Chem. Biol. Interact.* **2003**, 143–144, 93–100.
- (298) Sayre, L. M.; Lin, D.; Yuan, Q.; Zhu, X.; Tang, X. Protein Adducts Generated from Products of Lipid Oxidation: Focus on HNE and ONE. *Drug Metab. Rev.* **2006**, 38 (4), 651–675.

- (299) Wakita, C.; Honda, K.; Shibata, T.; Akagawa, M.; Uchida, K. A Method for Detection of 4-Hydroxy-2-Nonenal Adducts in Proteins. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *51* (1), 1–4.
- (300) Doorn, J. A.; Petersen, D. R. Covalent Modification of Amino Acid Nucleophiles by the Lipid Peroxidation Products 4-Hydroxy-2-Nonenal and 4-Oxo-2-Nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, *15* (11), 1445–1450.
- (301) Itakura, K.; Osawa, T.; Uchida, K. Structure of a Fluorescent Compound Formed from 4-Hydroxy-2-Nonenal and N α -Hippuryllysine: A Model for Fluorophores Derived from Protein Modifications by Lipid Peroxidation. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (1), 185–187.
- (302) Xu, G.; Sayre, L. M. Structural Characterization of a 4-Hydroxy-2-Alkenal-Derived Fluorophore That Contributes to Lipoperoxidation-Dependent Protein Cross-Linking in Aging and Degenerative Disease. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (4), 247–251.
- (303) Xu, G.; Liu, Y.; Sayre, L. M. Independent Synthesis, Solution Behavior, and Studies on the Mechanism of Formation of a Primary Amine-Derived Fluorophore Representing Cross-Linking of Proteins by (E)-4-Hydroxy-2-Nonenal. *J. Org. Chem.* **1999**, *64* (16), 5732–5745.
- (304) Sayre, L. M.; Arora, P. K.; Iyer, R. S.; Salomon, R. G. Pyrrole Formation from 4-Hydroxynonenal and Primary Amines. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6* (1), 19–22.
- (305) Napetschnig, S.; Schauenstein, E.; Esterbauer, H. Formation of a Pyridinium Derivative by Reaction of 4-Hydroxypentenal with Glycine. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *68* (3–4), 165–177.
- (306) Isom, A. L.; Barnes, S.; Wilson, L.; Kirk, M.; Coward, L.; Darley-Usmar, V. Modification of Cytochrome c by 4-Hydroxy-2-Nonenal: Evidence for Histidine, Lysine, and Arginine-Aldehyde Adducts. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (8), 1136–1147.
- (307) Zhang, W.-H.; Liu, J.; Xu, G.; Yuan, Q.; Sayre, L. M. Model Studies on Protein Side Chain Modification by 4-Oxo-2-Nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (4), 512–523.
- (308) Oe, T.; Arora, J. S.; Lee, S. H.; Blair, I. A. A Novel Lipid Hydroperoxide-Derived Cyclic Covalent Modification to Histone H4. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (43), 42098–42105.
- (309) Liu, Z.; Minkler, P. E.; Sayre, L. M. Mass Spectroscopic Characterization of Protein Modification by 4-Hydroxy-2-(E)-Nonenal and 4-Oxo-2-(E)-Nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (7), 901–911.
- (310) Zhu, X.; Sayre, L. M. Mass Spectrometric Evidence for Long-Lived Protein Adducts of 4-Oxo-2-Nonenal. *Redox Rep.* **2007**, *12* (1–2), 45–49.
- (311) Yocum, A. K.; Oe, T.; Yergey, A. L.; Blair, I. A. Novel Lipid Hydroperoxide-Derived Hemoglobin Histidine Adducts as Biomarkers of Oxidative Stress. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40* (6), 754–764.
- (312) Zhu, X.; Sayre, L. M. Long-Lived 4-Oxo-2-Enal-Derived Apparent Lysine Michael Adducts Are Actually the Isomeric 4-Ketoamides. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20* (2), 165–170.

- (313) May-Zhang, L. S.; Yermalitsky, V.; Melchior, J. T.; Morris, J.; Tallman, K. A.; Borja, M. S.; Pleasant, T.; Amarnath, V.; Song, W.; Yancey, P. G.; Davidson, W. S.; Linton, M. F.; Davies, S. S. Modified Sites and Functional Consequences of 4-Oxo-2-Nonenal Adducts in HDL That Are Elevated in Familial Hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294* (50), 19022–19033.
- (314) Shibata, T.; Shimozu, Y.; Wakita, C.; Shibata, N.; Kobayashi, M.; Machida, S.; Kato, R.; Itabe, H.; Zhu, X.; Sayre, L. M.; Uchida, K. Lipid Peroxidation Modification of Protein Generates N ϵ -(4-Oxononanoyl)Lysine as a Pro-Inflammatory Ligand. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (22), 19943–19957.
- (315) Galligan, J. J.; Rose, K. L.; Beavers, W. N.; Hill, S.; Tallman, K. A.; Tansey, W. P.; Marnett, L. J. Stable Histone Adduction by 4-Oxo-2-Nonenal: A Potential Link between Oxidative Stress and Epigenetics. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (34), 11864–11866.
- (316) Cui, Y.; Li, X.; Lin, J.; Hao, Q.; Li, X. D. Histone Ketoamide Adduction by 4-Oxo-2-Nonenal Is a Reversible Posttranslational Modification Regulated by Sirt2. *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12* (1), 47–51.
- (317) Shimozu, Y.; Hirano, K.; Shibata, T.; Shibata, N.; Uchida, K. 4-Hydroperoxy-2-Nonenal Is Not Just an Intermediate but a Reactive Molecule That Covalently Modifies Proteins to Generate Unique Intramolecular Oxidation Products. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (33), 29313–29324.
- (318) Oe, T.; Lee, S. H.; Silva Elipe, M. V.; Arison, B. H.; Blair, I. A. A Novel Lipid Hydroperoxide-Derived Modification to Arginine. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (12), 1598–1605.
- (319) Lee, S. H.; Takahashi, R.; Goto, T.; Oe, T. Mass Spectrometric Characterization of Modifications to Angiotensin II by Lipid Peroxidation Products, 4-Oxo-2(E)-Nonenal and 4-Hydroxy-2(E)-Nonenal. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23* (11), 1771–1785.
- (320) Zamora, R.; Gallardo, E.; Hidalgo, F. J. Amine Degradation by 4,5-Epoxy-2-Decenal in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (6), 2398–2404.
- (321) Hidalgo, F. J.; Zamora, R. Fluorescent Pyrrole Products from Carbonyl-Amine Reactions. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268* (22), 16190–16197.
- (322) Zamora, R.; Hidalgo, F. J. Modification of Lysine Amino Groups by the Lipid Peroxidation Product 4,5(E)-Epoxy-2(E)-Heptenal. *Lipids* **1994**, *29* (4), 243–249.
- (323) Zamora, R.; Alaiz, M.; Hidalgo, F. J. Determination of ϵ -N-Pyrrolylnorleucine in Fresh Food Products. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (5), 1942–1947.
- (324) Chikazawa, M.; Yoshitake, J.; Lim, S.-Y.; Iwata, S.; Negishi, L.; Shibata, T.; Uchida, K. Glycolaldehyde Is an Endogenous Source of Lysine N-Pyrrolation. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295* (22), 7697–7709.
- (325) Zamora, R.; Hidalgo, F. J. 2-Alkylpyrrole Formation from 4,5-Epoxy-2-Alkenals. *Chem. Res. Toxicol.* **2005**, *18* (2), 342–348.
- (326) Liu, Z.; Sayre, L. M. Model Studies on the Modification of Proteins by Lipoxidation-Derived 2-Hydroxyaldehydes. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16* (2), 232–241.
- (327) Kern, W.; Spiteller, G. Synthesis and Properties of Natural Occurring α -Hydroxyaldehydes. *Tetrahedron* **1996**, *52* (12), 4347–4362.

- (328) Itakura, K.; Uchida, K. Reaction of N α -Hippuryllysine with 2-Hydroxyheptanal: A Model for Lysine-Directed Protein Modifications by Lipid Peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *124* (2), 81–88.
- (329) Shigeta, T.; Sasamoto, K.; Yamamoto, T. A Novel Crosslinked Type of Advanced Glycation End-Product Derived from Lactaldehyde. *Heliyon* **2020**, *6* (11), e5337.
- (330) Fujimoto, S.; Murakami, Y.; Miyake, H.; Hayase, F.; Watanabe, H. Identification of a Novel Advanced Glycation End Product Derived from Lactaldehyde. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83* (6), 1136–1145.
- (331) Argirov, O. K.; Lin, B.; Ortwerth, B. J. 2-Ammonio-6-(3-Oxidopyridinium-1-Yl)Hexanoate (OP-Lysine) Is a Newly Identified Advanced Glycation End Product in Cataractous and Aged Human Lenses. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (8), 6487–6495.
- (332) Nagai, R.; Hayashi, C. M.; Xia, L.; Takeya, M.; Horiuchi, S. Identification in Human Atherosclerotic Lesions of GA-Pyridine, a Novel Structure Derived from Glycolaldehyde-Modified Proteins. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (50), 48905–48912.
- (333) Fenaille, F.; Tabet, J.-C.; Guy, P. A. Study of Peptides Containing Modified Lysine Residues by Tandem Mass Spectrometry: Precursor Ion Scanning of Hexanal-Modified Peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (1), 67–76.
- (334) Suyama, K.; Adachi, S. Reaction of Alkanals and Amino Acids or Primary Amines. Synthesis of 1,2,3,5- and 1,3,4,5-Substituted Quaternary Pyridinium Salts. *J. Org. Chem.* **1979**, *44* (9), 1417–1420.
- (335) Suyama, K.; Suganuma, O.; Adachi, S. Quaternary Pyridinium Compounds Formed by Reaction of Primary Amines with Alkanals and Their Antimicrobial Activities. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45* (7), 1535–1539.
- (336) Kato, H.; Kaneko, S.; Okitani, A.; Ito, M.; Hayase, F. Modification of Lysine Residues to Alkyl-Substituted Pyridiniums on Exposure of Proteins to Vaporized Hexanal. *Agric. Biol. Chem.* **1986**, *50* (5), 1223–1228.
- (337) Cai, J.; Bhatnagar, A.; Pierce, W. M. Protein Modification by Acrolein: Formation and Stability of Cysteine Adducts. *Chem. Res. Toxicol.* **2009**, *22* (4), 708–716.
- (338) Chavez, J. D.; Wu, J.; Bisson, W.; Maier, C. S. Site-Specific Proteomic Analysis of Lipoxidation Adducts in Cardiac Mitochondria Reveals Chemical Diversity of 2-Alkenal Adduction. *J. Proteomics* **2011**, *74* (11), 2417–2429.
- (339) Wu, J.; Stevens, J. F.; Maier, C. S. Mass Spectrometry-Based Quantification of Myocardial Protein Adducts with Acrolein in an in Vivo Model of Oxidative Stress. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (9), 1401–1410.
- (340) Maeshima, T.; Honda, K.; Chikazawa, M.; Shibata, T.; Kawai, Y.; Akagawa, M.; Uchida, K. Quantitative Analysis of Acrolein-Specific Adducts Generated during Lipid Peroxidation–Modification of Proteins in Vitro: Identification of N τ -(3-Propanal)Histidine as the Major Adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **2012**, *25* (7), 1384–1392.
- (341) Furuhashi, A.; Ishii, T.; Kumazawa, S.; Yamada, T.; Nakayama, T.; Uchida, K. N ϵ -(3-Methylpyridinium)Lysine, a Major Antigenic Adduct Generated in Acrolein-Modified Protein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (49), 48658–48665.
- (342) Ichihashi, K.; Osawa, T.; Toyokuni, S.; Uchida, K. Endogenous Formation of Protein Adducts with Carcinogenic Aldehydes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (26), 23903–23913.

- (343) Ishino, K.; Wakita, C.; Shibata, T.; Toyokuni, S.; Machida, S.; Matsuda, S.; Matsuda, T.; Uchida, K. Lipid Peroxidation Generates Body Odor Component Trans-2-Nonenal Covalently Bound to Protein in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285* (20), 15302–15313.
- (344) Globisch, M.; Schindler, M.; Kreßler, J.; Henle, T. Studies on the Reaction of Trans-2-Heptenal with Peanut Proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62* (33), 8500–8507.
- (345) Baker, A.; Židek, L.; Wiesler, D.; Chmelík, J.; Pagel, M.; Novotny, M. V. Reaction of N-Acetylglycyllysine Methyl Ester with 2-Alkenals: An Alternative Model for Covalent Modification of Proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11* (7), 730–740.
- (346) Alaiz, M.; Barragán, S. Reaction of a Lysyl Residue Analogue with E-2-Octenal. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *75* (1), 43–49.
- (347) Globisch, M.; Deuber, M.; Henle, T. Identification and Quantitation of the Lipation Product 2-Amino-6-(3-Methylpyridin-1-Ium-1-Yl)Hexanoic Acid (MP-Lysine) in Peanuts. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64* (34), 6605–6612.
- (348) Bispo, V. S.; de Arruda Campos, I. P.; Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G. Structural Elucidation of a Carnosine-Acrolein Adduct and Its Quantification in Human Urine Samples. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 19348.
- (349) Uchida, K.; Kanematsu, M.; Morimitsu, Y.; Osawa, T.; Noguchi, N.; Niki, E. Acrolein Is a Product of Lipid Peroxidation Reaction. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (26), 16058–16066.
- (350) Lambert, C.; Li, J.; Jonscher, K.; Yang, T.-C.; Reigan, P.; Quintana, M.; Harvey, J.; Freed, B. M. Acrolein Inhibits Cytokine Gene Expression by Alkylating Cysteine and Arginine Residues in the NF-KB1 DNA Binding Domain. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (27), 19666–19675.
- (351) Gan, J. C.; Oandasan, A.; Ansari, G. A. S. Covalent Modification of Serum Albumin by Acrolein. *Chemosphere* **1991**, *23* (7), 939–947.
- (352) Sigolo, C. A. O.; Mascio, P. Di; Medeiros, M. H. G. Covalent Modification of Cytochrome c Exposed to Trans, Trans-2,4-Decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20* (8), 1099–1110.
- (353) Zhu, X.; Tang, X.; Zhang, J.; Tochtrop, G. P.; Anderson, V. E.; Sayre, L. M. Mass Spectrometric Evidence for the Existence of Distinct Modifications of Different Proteins by 2(E),4(E)-Decadienal. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23* (3), 467–473.
- (354) Keillor, J. W.; Clouthier, C. M.; Apperley, K. Y. P.; Akbar, A.; Mulani, A. Acyl Transfer Mechanisms of Tissue Transglutaminase. *Bioorg. Chem.* **2014**, *57*, 186–197.
- (355) Motoki, M.; Seguro, K. Transglutaminase and Its Use for Food Processing. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, *9* (5), 204–210.
- (356) Singh, H. Modification of Food Proteins by Covalent Crosslinking. *Trends Food Sci. Technol.* **1991**, *2*, 196–200.
- (357) Rombouts, I.; Lagrain, B.; Brunnbauer, M.; Koehler, P.; Brijs, K.; Delcour, J. A. Identification of Isopeptide Bonds in Heat-Treated Wheat Gluten Peptides. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (4), 1236–1243.
- (358) Sakamoto, H.; Kumazawa, Y.; Kawajiri, H.; Motoki, M. ϵ -(γ -Glutamyl)Lysine Crosslink Distribution in Foods as Determined by Improved Method. *J. Food Sci.* **1995**, *60* (2), 416–420.

- (359) Seguro, K.; Kumazawa, Y.; Kuraishi, C.; Sakamoto, H.; Motoki, M. The ϵ -(γ -Glutamyl)Lysine Moiety in Crosslinked Casein Is an Available Source of Lysine for Rats. *J. Nutr.* **1996**, *126* (10), 2557–2562.
- (360) Fink, M. L.; Chung, S. I.; Folk, J. E. Gamma-Glutamylamine Cyclotransferase: Specificity toward Epsilon-(L-Gamma-Glutamyl)-L-Lysine and Related Compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77* (8), 4564–4568.
- (361) Friedman, M. Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins. **1999**, *47* (4), 27.
- (362) Meyer, M.; Klostermeyer, H.; Kleyn, D. H. Verminderte Bildung von Lysinoalanin Bei Enzymatisch Dephosphoryliertem Casein. *Z Leb. Unters Forch* **1981**, *172* (6), 446–448.
- (363) Kleyn, D. H.; Klostermeyer, H. Dehydroalanin Als Reaktionsprodukt Bei Der Erhitzung von β -Casein. *Z Leb. Unters Forch* **1980**, *170* (1), 11–13.
- (364) Hasegawa, K.; Kitajima, S.; Takado, Y. An Examination of Intermolecular Lysinoalanine Formation Using Dephosphorylated Casein and Succinylated Proteins. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, *45* (9), 2133–2134.
- (365) Henle, T.; Walter, A. W.; Klostermeyer, H. Detection and Identification of the Cross-Linking Amino Acids N τ - and N π -(2'-Amino-2'-Carboxy-Ethyl)-1-Histidine (“histidinoalanine”, HAL) in Heated Milk Products. *Z Leb. Unters Forch* **1993**, *197* (2), 114–117.
- (366) Walter, A. W.; Henle, T.; Haeßner, R.; Klostermeyer, H. Studies on the Formation of Lysinomethylalanine and Histidinomethylalanine in Milk Products. *Z Leb. Unters Forch* **1994**, *199* (3), 243–247.
- (367) Fenaille, F.; Parisod, V.; Visani, P.; Populaire, S.; Tabet, J.-C.; Guy, P. A. Modifications of Milk Constituents during Processing: A Preliminary Benchmarking Study. *Int. Dairy J.* **2006**, *16* (7), 728–739.
- (368) Bulca, S.; Dumpler, J.; Kulozik, U. Kinetic Description of Heat-Induced Cross-Linking Reactions of Whey Protein-Free Casein Solutions. *Int. J. Dairy Technol.* **2016**, *69* (4), 489–496.
- (369) Faist, V.; Drusch, S.; Kiesner, C.; Elmadfa, I.; Erbersdobler, H. F. Determination of Lysinoalanine in Foods Containing Milk Protein by High-Performance Chromatography after Derivatisation with Dansyl Chloride. *Int. Dairy J.* **2000**, *10* (5–6), 339–346.
- (370) Rombouts, I.; Lagrain, B.; Brijs, K.; Delcour, J. A. Cross-Linking of Wheat Gluten Proteins during Production of Hard Pretzels. *Amino Acids* **2012**, *42* (6), 2429–2438.
- (371) Akıllıoğlu, H. G.; Lund, M. N. Quantification of Advanced Glycation End Products and Amino Acid Cross-Links in Foods by High-Resolution Mass Spectrometry: Applicability of Acid Hydrolysis. *Food Chem.* **2022**, *366*, 130601.
- (372) Soboleva, A.; Vikhnina, M.; Grishina, T.; Frolov, A. Probing Protein Glycation by Chromatography and Mass Spectrometry: Analysis of Glycation Adducts. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (12), 2557.
- (373) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Analysis of Glyoxal- and Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products during Grilling of Porcine Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (50), 15374–15383.

- (374) Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of Free and Protein-Bound Carboxymethyllysine and Carboxyethyllysine in Meats during Commercial Sterilization. *Meat Sci.* **2016**, *116*, 1–7.
- (375) Chen, G.; Scott Smith, J. Determination of Advanced Glycation Endproducts in Cooked Meat Products. *Food Chem.* **2015**, *168*, 190–195.
- (376) Sun, X.; Li, X.; Tang, J.; Lai, K.; Rasco, B. A.; Huang, Y. Formation of Protein-Bound N ϵ -Carboxymethyllysine and N ϵ -Carboxyethyllysine in Ground Pork during Commercial Sterilization as Affected by the Type and Concentration of Sugars. *Food Chem.* **2021**, *336*, 127706.
- (377) Yu, L.; Gao, C.; Zeng, M.; He, Z.; Wang, L.; Zhang, S.; Chen, J. Effects of Raw Meat and Process Procedure on N ϵ -Carboxymethyllysine and N ϵ -Carboxyethyl-Lysine Formation in Meat Products. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25* (4), 1163–1168.
- (378) Zhang, Z.; Cheng, W.; Wang, X.; Wang, M.; Chen, F.; Cheng, K.-W. A Novel Formation Pathway of N ϵ -(Carboxyethyl)Lysine from Lactic Acid during High Temperature Exposure in Wheat Sourdough Bread and Chemical Model. *Food Chem.* **2022**, *388*, 132942.
- (379) Roldan, M.; Loebner, J.; Degen, J.; Henle, T.; Antequera, T.; Ruiz-Carrascal, J. Advanced Glycation End Products, Physico-Chemical and Sensory Characteristics of Cooked Lamb Loins Affected by Cooking Method and Addition of Flavour Precursors. *Food Chem.* **2015**, *168*, 487–495.
- (380) Rakete, S.; Glomb, M. A. A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (16), 3828–3833.
- (381) Meinert, L.; Schäfer, A.; Bjergegaard, C.; Aaslyng, M. D.; Bredie, W. L. P. Comparison of Glucose, Glucose 6-Phosphate, Ribose, and Mannose as Flavour Precursors in Pork; the Effect of Monosaccharide Addition on Flavour Generation. *Meat Sci.* **2009**, *81* (3), 419–425.
- (382) Meinert, L.; Andersen, L. T.; Bredie, W. L. P.; Bjergegaard, C.; Aaslyng, M. D. Chemical and Sensory Characterisation of Pan-Fried Pork Flavour: Interactions between Raw Meat Quality, Ageing and Frying Temperature. *Meat Sci.* **2007**, *75* (2), 229–242.
- (383) Meinert, L.; Christiansen, S. C.; Kristensen, L.; Bjergegaard, C.; Aaslyng, M. D. Eating Quality of Pork from Pure Breeds and DLY Studied by Focus Group Research and Meat Quality Analyses. *Meat Sci.* **2008**, *80* (2), 304–314.
- (384) Cerny, C.; Davidek, T. Formation of Aroma Compounds from Ribose and Cysteine during the Maillard Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (9), 2714–2721.
- (385) Mottram, D. S. Flavour Formation in Meat and Meat Products: A Review. *Food Chem.* **1998**, *62* (4), 415–424.
- (386) Tikk, M.; Tikk, K.; Tørngren, M. A.; Meinert, L.; Aaslyng, M. D.; Karlsson, A. H.; Andersen, H. J. Development of Inosine Monophosphate and Its Degradation Products during Aging of Pork of Different Qualities in Relation to Basic Taste and Retronasal Flavor Perception of the Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (20), 7769–7777.
- (387) Mottram, D. S.; Nobrega, I. C. C. Formation of Sulfur Aroma Compounds in Reaction Mixtures Containing Cysteine and Three Different Forms of Ribose. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (14), 4080–4086.

- (388) *Löffler/Petrides Biochemie Und Pathobiochemie*; Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., Eds.; Springer-Lehrbuch; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, Heidelberg, 2014.
- (389) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Formation of α -Dicarbonyl Fragments from Mono- and Disaccharides under Caramelization and Maillard Reaction Conditions. *Z. Leb. Unters. Forch* **1998**, *207* (1), 50–54.
- (390) Stephens, J. W.; Dikeman, M. E.; Unruh, J. A.; Haub, M. D.; Tokach, M. D.; Dritz, S. S. Effects of Oral Administration of Sodium Citrate or Acetate to Pigs on Blood Parameters, Postmortem Glycolysis, Muscle pH Decline, and Quality Attributes of Pork. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86* (7), 1669–1677.
- (391) Stephens, J. W.; Dikeman, M. E.; Unruh, J. A.; Haub, M. D.; Tokach, M. D. Effects of Pre-Rigor Injection of Sodium Citrate or Acetate, or Post-Rigor Injection of Phosphate plus Salt on Post-Mortem Glycolysis, pH, and Pork Quality Attributes. *Meat Sci.* **2006**, *74* (4), 727–737.
- (392) Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Dicarbonyls (Glyoxal, Methylglyoxal, and 3-Deoxyglucosone). In *Uremic Toxins*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, NJ, USA, 2012; pp 177–192.
- (393) Nemet, I.; Vikić-Topić, D.; Varga-Defterdarović, L. Spectroscopic Studies of Methylglyoxal in Water and Dimethylsulfoxide. *Bioorg. Chem.* **2004**, *32* (6), 560–570.
- (394) Zhang, D.; Tang, Z.; Huang, H.; Zhou, G.; Cui, C.; Weng, Y.; Liu, W.; Kim, S.; Lee, S.; Perez-Neut, M.; Ding, J.; Czyn, D.; Hu, R.; Ye, Z.; He, M.; Zheng, Y. G.; Shuman, H. A.; Dai, L.; Ren, B.; Roeder, R. G.; Becker, L.; Zhao, Y. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lactylation. *Nature* **2019**, *574* (7779), 575–580.
- (395) Choe, J. H.; Choi, Y. M.; Lee, S. H.; Shin, H. G.; Ryu, Y. C.; Hong, K. C.; Kim, B. C. The Relation between Glycogen, Lactate Content and Muscle Fiber Type Composition, and Their Influence on Postmortem Glycolytic Rate and Pork Quality. *Meat Sci.* **2008**, *80* (2), 355–362.
- (396) Lanigan, R. M.; Sheppard, T. D. Recent Developments in Amide Synthesis: Direct Amidation of Carboxylic Acids and Transamidation Reactions. *European J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (33), 7453–7465.
- (397) Wu, J.; Gao, J.; Lin, J.; Cui, C.; Li, L.; He, S.; Brennan, C. Preparation and Taste Characteristics of Kokumi N-Lactoyl Phenylalanine in the Presence of Phenylalanine and Lactate. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (17), 5396–5407.
- (398) Christa, P.; Dunkel, A.; Krauss, A.; Stark, T. D.; Dawid, C.; Hofmann, T. Discovery and Identification of Tastants and Taste-Modulating N-Acyl Amino Acid Derivatives in Traditional Korean Fermented Dish Kimchi Using a Sensomics Approach. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (24), 7500–7514.
- (399) Bottesini, C.; Tedeschi, T.; Dossena, A.; Sforza, S. Enzymatic Production and Degradation of Cheese-Derived Non-Proteolytic Aminoacyl Derivatives. *Amino Acids* **2014**, *46* (2), 441–447.
- (400) Paolella, S.; Prandi, B.; Falavigna, C.; Buhler, S.; Dossena, A.; Sforza, S.; Galaverna, G. Occurrence of Non-Proteolytic Amino Acyl Derivatives in Dry-Cured Ham. *Food Res. Int.* **2018**, *114*, 38–46.
- (401) Sforza, S.; Cavatorta, V.; Galaverna, G.; Dossena, A.; Marchelli, R. Accumulation of Non-Proteolytic Aminoacyl Derivatives in Parmigiano-Reggiano Cheese during Ripening. *Int. Dairy J.* **2009**, *19* (10), 582–587.

- (402) Sgarbi, E.; Lazzi, C.; Iacopino, L.; Bottesini, C.; Lambertini, F.; Sforza, S.; Gatti, M. Microbial Origin of Non Proteolytic Aminoacyl Derivatives in Long Ripened Cheeses. *Food Microbiol.* **2013**, *35* (2), 116–120.
- (403) Jansen, R. S.; Addie, R.; Merckx, R.; Fish, A.; Mahakena, S.; Bleijerveld, O. B.; Altelaar, M.; IJlst, L.; Wanders, R. J.; Borst, P.; van de Wetering, K. N -Lactoyl-Amino Acids Are Ubiquitous Metabolites That Originate from CNDP2-Mediated Reverse Proteolysis of Lactate and Amino Acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2015**, *112* (21), 6601–6606.
- (404) Gaffney, D. O.; Jennings, E. Q.; Anderson, C. C.; Marentette, J. O.; Shi, T.; Schou Oxvig, A.-M.; Streeter, M. D.; Johannsen, M.; Spiegel, D. A.; Chapman, E.; Roede, J. R.; Galligan, J. J. Non-Enzymatic Lysine Lactoylation of Glycolytic Enzymes. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27* (2), 206-213.e6.
- (405) Zhang, X.; Mao, Y.; Wang, B.; Cui, Z.; Zhang, Z.; Wang, Z.; Chen, T. Screening, Expression, Purification and Characterization of CoA-Transferases for Lactoyl-CoA Generation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *46* (7), 899–909.
- (406) Choi, S. Y.; Park, S. J.; Kim, W. J.; Yang, J. E.; Lee, H.; Shin, J.; Lee, S. Y. One-Step Fermentative Production of Poly(Lactate-Co-Glycolate) from Carbohydrates in *Escherichia Coli*. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34* (4), 435–440.
- (407) Varner, E. L.; Trefely, S.; Bartee, D.; von Krusenstiern, E.; Izzo, L.; Bekeova, C.; O'Connor, R. S.; Seifert, E. L.; Wellen, K. E.; Meier, J. L.; Snyder, N. W. Quantification of Lactoyl-CoA (Lactyl-CoA) by Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Mammalian Cells and Tissues. *Open Biol.* **2020**, *10* (9), 200187.
- (408) Thornalley, P. J. The Glyoxalase System: New Developments towards Functional Characterization of a Metabolic Pathway Fundamental to Biological Life. *Biochem. J.* **1990**, *269* (1), 1–11.
- (409) Uotila, L. Purification and Characterization of S-2-Hydroxyacylglutathione Hydrolase (Glyoxalase II) from Human Liver. *Biochemistry* **1973**, *12* (20), 3944–3951.
- (410) Vander Jagt, D. L.; Han, L.-P. B.; Lehman, C. H. Kinetic Evaluation of Substrate Specificity in the Glyoxalase-I-Catalyzed Disproportionation of α -Ketoaldehydes. *Biochemistry* **1972**, *11* (20), 3735–3740.
- (411) Uchino, E.; Fukushima, T.; Tsunoda, M.; Santa, T.; Imai, K. Determination of Rat Blood S-D-Lactoylglutathione by a Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography with Precolumn Fluorescence Derivatization with 4-Fluoro-7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazole. *Anal. Biochem.* **2004**, *330* (2), 186–192.
- (412) McLellan, A. C.; Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Assay of S-D-Lactoylglutathione in Biological Systems. *Anal. Biochem.* **1993**, *211* (1), 37–43.
- (413) Thornalley, P. J.; Hooper, N. I.; Jennings, P. E.; Florkowski, C. M.; Jones, A. F.; Lunec, J.; Barnett, A. H. The Human Red Blood Cell Glyoxalase System in Diabetes Mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **1989**, *7* (2), 115–120.
- (414) Lo, T. W. C.; Westwood, M. E.; McLellan, A. C.; Selwood, T.; Thornalley, P. J. Binding and Modification of Proteins by Methylglyoxal under Physiological Conditions. A Kinetic and Mechanistic Study with N-Alpha-Acetylarginine, N-Alpha-Acetylcysteine, and N-Alpha-Acetyllysine, and Bovine Serum Albumin. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269* (51), 32299–32305.
- (415) Weber, A. L. Formation of the Thioester, N-Acetyl, S-Lactoylcysteine, by Reaction of N-Acetylcysteine with Pyruvaldehyde in Aqueous Solution. *J. Mol. Evol.* **1982**, *18* (5), 354–359.

- (416) Ilisz, I.; Berkecz, R.; Péter, A. Application of Chiral Derivatizing Agents in the High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers: A Review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47* (1), 1–15.
- (417) Schwarzenbolz, U.; Mende, S.; Henle, T. Model Studies on Protein Glycation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126* (1), 248–252.
- (418) Eggen, M. D.; Merboth, P.; Neukirchner, H.; Glomb, M. A. Lipid Peroxidation Has Major Impact on Malondialdehyde-Derived but Only Minor Influence on Glyoxal and Methylglyoxal-Derived Protein Modifications in Carbohydrate-Rich Foods. *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70* (33), 10271–10283.
- (419) Sugiura, K.; Koike, S.; Suzuki, T.; Ogasawara, Y. Oxidative Formation of Methylglyoxal in Glycerol Preparations during Storage. *Biol. Pharm. Bull.* **2020**, *43* (5), 879–883.
- (420) Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A.-M. Tocopherol, Tocotrienol and Plant Sterol Contents of Vegetable Oils and Industrial Fats. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21* (2), 152–161.
- (421) Wellner, A.; Nußpickel, L.; Henle, T. Glycation Compounds in Peanuts. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, *234* (3), 423–429.
- (422) Gupta, S.; Hollenstein, R.; Kochhar, S.; Christen, P. Paracatalytic Self-Inactivation of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase. Structure of the Crosslink Formed at the Active Site. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214* (2), 515–519.
- (423) Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (15), 3957–3965.
- (424) Shriner, R. L.; Neumann, F. W. The Chemistry of the Amidines. *Chem. Rev.* **1944**, *35* (3), 351–425.
- (425) Sharavanan, K.; Komber, H.; Fischer, D.; Böhme, F. Hydrolytic Degradation of Polyamidines and Its Potential Application in Controlled Release of Active Agents. *Polymer (Guildf)*. **2004**, *45* (7), 2127–2132.
- (426) Hegele, J.; Parisod, V.; Richoz, J.; Förster, A.; Maurer, S.; Krause, R.; Henle, T.; Büttler, T.; Delatour, T. Evaluating the Extent of Protein Damage in Dairy Products. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126* (1), 300–306.
- (427) Okamoto, Y.; Kinoshita, T. A Direct Reductive Deamination of Amidines with Sodium Borohydride. Formation of Deaminated Compounds and Secondary Amines. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1981**, *29* (4), 1165–1169.
- (428) Zhang, J.; Chang, H. M.; Kane, R. R. Reductive Monoalkylation of Aromatic Amines via Amidine Intermediates. *Synlett* **2001**, No. 5, 643–645.
- (429) Iberg, N.; Fluckiger, R. Nonenzymatic Glycosylation of Albumin in Vivo. Identification of Multiple Glycosylated Sites. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (29), 13542–13545.
- (430) Shapiro, R.; McManus, M. J.; Zalut, C.; Bunn, H. F. Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin A. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255* (7), 3120–3127.
- (431) Gazi, I.; Franc, V.; Tamara, S.; van Gool, M. P.; Huppertz, T.; Heck, A. J. R. Identifying Glycation Hot-Spots in Bovine Milk Proteins during Production and Storage of Skim Milk Powder. *Int. Dairy J.* **2022**, *129*, 105340.

- (432) Fan, F.; Liu, M.; Shi, P.; Xu, X.; Lu, W.; Wang, Z.; Du, M. Protein Cross-Linking and the Maillard Reaction Decrease the Solubility of Milk Protein Concentrates. *Food Sci. Nutr.* **2018**, *6* (5), 1196–1203.
- (433) Oliver, C. M.; Melton, L. D.; Stanley, R. A. Creating Proteins with Novel Functionality via the Maillard Reaction: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, *46* (4), 337–350.
- (434) Klaus, A.; Rau, R.; Glomb, M. A. Modification and Cross-Linking of Proteins by Glycolaldehyde and Glyoxal: A Model System. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (41), 10835–10843.
- (435) Dai, Z.; Wang, B.; Sun, G.; Fan, X.; Anderson, V. E.; Monnier, V. M. Identification of Glucose-Derived Cross-Linking Sites in Ribonuclease A. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (7), 2756–2768.
- (436) Gostomska-Pampuch, K.; Wiśniewski, J. R.; Sowiński, K.; Gruszecki, W. I.; Gamian, A.; Staniszevska, M. Analysis of the Site-Specific Myoglobin Modifications in the Melibiose-Derived Novel Advanced Glycation End-Product. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (21), 13036.
- (437) Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (32), 19338–19345.
- (438) Odani, H.; Shinzato, T.; Usami, J.; Matsumoto, Y.; Brinkmann Frye, E.; Baynes, J. W.; Maeda, K. Imidazolium Crosslinks Derived from Reaction of Lysine with Glyoxal and Methylglyoxal Are Increased in Serum Proteins of Uremic Patients: Evidence for Increased Oxidative Stress in Uremia. *FEBS Lett.* **1998**, *427* (3), 381–385.
- (439) Chellan, P.; Nagaraj, R. H. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Dicarbonyl-Derived Imidazolium Crosslinks in Aging and Diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *368* (1), 98–104.
- (440) Frye, E. B.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (30), 18714–18719.
- (441) Dyer, D. G.; Blackledge, J. A.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Formation of Pentosidine during Nonenzymatic Browning of Proteins by Glucose. Identification of Glucose and Other Carbohydrates as Possible Precursors of Pentosidine in Vivo. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266* (18), 11654–11660.
- (442) Odetti, P.; Fogarty, J.; Sell, D. R.; Monnier, V. M. Chromatographic Quantitation of Plasma and Erythrocyte Pentosidine in Diabetic and Uremic Subjects. *Diabetes* **1992**, *41* (2), 153–159.
- (443) Miyata, T.; Ueda, Y.; Yoshida, A.; Sugiyama, S.; Iida, Y.; Jadoul, M.; Maeda, K.; Kurokawa, K.; van Ypersele de Strihou, C. Clearance of Pentosidine, an Advanced Glycation End Product, by Different Modalities of Renal Replacement Therapy. *Kidney Int.* **1997**, *51* (3), 880–887.
- (444) Sell, D. R.; Biemel, K. M.; Reihl, O.; Lederer, M. O.; Strauch, C. M.; Monnier, V. M. Glucosepane Is a Major Protein Cross-Link of the Senescent Human Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (13), 12310–12315.
- (445) Biemel, K. M.; Bühler, H. P.; Reihl, O.; Lederer, M. O. Identification and Quantitative Evaluation of the Lysine-Arginine Crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and Glucosepane in Foods. *Nahrung/Food* **2001**, *45* (3), 210–214.

-
- (446) Zhang, G.; Huang, G.; Xiao, L.; Mitchell, A. E. Determination of Advanced Glycation Endproducts by LC-MS/MS in Raw and Roasted Almonds (*Prunus Dulcis*). *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (22), 12037–12046.
- (447) Henle, T.; Schwarzenbolz, U.; Klostermeyer, H. Detection and Quantification of Pentosidine in Foods. *Z. Leb. Unters. Forsch.* **1997**, *204* (2), 95–98.
- (448) Chao, P.; Hsu, C.; Yin, M. Analysis of Glycative Products in Sauces and Sauce-Treated Foods. *Food Chem.* **2009**, *113* (1), 262–266.

10 Einzelpublikationen

10.1 Publikation 1 *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (28), 7960–7968

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

pubs.acs.org/JAFC

Article

Novel Amidine Protein Cross-Links Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine

Michael D. Eggen and Marcus A. Glomb*

 Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 7960–7968

 Read Online

ACCESS |

 Metrics & More

 Article Recommendations

 Supporting Information

ABSTRACT: One crucial aspect of the Maillard reaction is the formation of reactive α -dicarbonyl structures like glyoxal, which are prone toward further reactions with proteins, e.g., the N^{ϵ} -amino group of lysine. The initially formed labile glyoxal-imine was previously established as a key intermediate in the formation of the advanced glycation end products N^{ϵ} -carboxymethyl lysine (CML), glyoxal lysine amide (GOLA), glyoxal lysine dimer (GOLD), and N^{ϵ} -glycolyl lysine (GALA). Here, we introduce a novel amidine cross-link structure N^1,N^2 -bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-acetamidine (glyoxal lysine amidine, GLA), which is formed exclusively from glyoxal through the same isomerization cascade. After independent synthesis of the authentic reference standard, we were able to quantitate this cross-link in incubations of 40 mM N^{ϵ} -t-Boc-lysine with glyoxal and various sugars (40–100 mM) under mild conditions (pH 7.4, 37 °C) using an HPLC–MS/MS method. Furthermore, incubations of proteins (6 mg/mL) with 50 mM glyoxal confirmed the cross-linking by GLA, which was additionally identified in acidic hydrolyzed proteins of butter biscuits after HPLC enrichment.

KEYWORDS: Maillard reaction, protein cross-linking, amidine, glyoxal, advanced glycation end products

INTRODUCTION

The Maillard reaction or non-enzymatic browning describes a complex reaction series of reducing sugars with amine components, resulting in a plethora of colored and aroma active structures, which are generally desirable in processed foods.¹ However, the Maillard reaction also leads to adverse byproducts like toxic acrylamide or off-flavors.^{1,2} From a mechanistic point of view, free amino groups of amino acids, peptides, or proteins initially attack the carbonyl group of reducing sugars to form Schiff bases, which are further converted by rearrangement into the more stable Amadori products.³ A complex series of reactions, involving isomerization, dehydration, fragmentation, and redox reactions form reactive α -dicarbonyl structures as the central intermediates in the Maillard reaction. Among these, the short-chained 1,2-dicarbonyl structures glyoxal and methylglyoxal are highly susceptible to reaction with lysine and arginine side chains of proteins, resulting in a variety of stable protein adducts, which are summarized under the term advanced glycation end products (AGEs). The formation of these protein adducts is favored under conditions of food processing like cooking, baking, or frying, which influence both the texture and nutritious quality of the food.¹ On the other side, AGE formation also takes place *in vivo* and is shown to accumulate in various long-lived tissue proteins with ageing⁴ and diseases as diabetes⁵ and nephropathy.⁶ However, the Maillard reaction *in vivo* is complex because additional enzymatic pathways alter the reaction cascades.^{7,8} One established marker of AGE formation *in vivo* and in food is N^{ϵ} -carboxymethyl lysine, which is formed by the reaction of glyoxal with lysine via isomerization and other different pathways including the direct oxidative fragmentation of the Amadori product.^{9,10} In general,

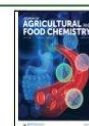
AGEs can be divided based on their structure in monovalent and protein cross-linking bivalent compounds. In recent years, the molecular structures of several cross-links were revealed, mainly derived from the reaction of glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO), and 3-deoxyglucosone (3-DG) with arginine and lysine side chains of proteins via isomerization or cyclization.⁸ So far, two basic lysine–lysine cross-link classes derived either from glyoxal, methylglyoxal, or 3-DG were elucidated: the imidazolium-type glyoxal lysine dimer (GOLD), methylglyoxal lysine dimer (MOLD), and 3-deoxyglucosone lysine dimer (DOLD) and the amide-type glyoxal lysine amide (GOLA) and methylglyoxal lysine amide (MOLA).^{5,11–13} Similarly, the formations of amino-imidazolium AGEs glyoxal-derived imidazoline cross-link (GODIC), methylglyoxal-derived imidazoline cross-link (MODIC), and 3-deoxyglucosone-derived imidazoline cross-link (DODIC) were explained by the reaction of one lysine and one arginine residue with GO, MGO, and 3-DG.^{14,15} In addition, bicyclic cross-links glucosepan, pentosidin, and vesperlysine were proposed to be products of the reaction of lysine and arginine with hexoses, pentoses, and ascorbates, respectively.^{16–18} Most of the cross-links described were first detected in model incubations containing high concentrations of reactive α -dicarbonyls or sugars and were later found to be present both *in vivo* or in processed foods.^{8,12,19,20}

Received: May 11, 2021

Revised: June 24, 2021

Accepted: June 27, 2021

Published: July 9, 2021



 ACS Publications

© 2021 The Authors. Published by
American Chemical Society

7960

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02792>
J. Agric. Food Chem. 2021, 69, 7960–7968

In this work, we revealed the structure of a novel lysine–lysine amidine cross-link formed by reaction of glyoxal and lysine under physiological conditions, which we named GLA or glyoxal lysine amidine (N^1, N^2 -bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-acetamidine). Coupled liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) enabled the quantitation of this novel acid-stable AGE-cross-link structure in various model incubations. Furthermore, collision-induced dissociation experiments confirmed the presence of GLA in food proteins.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest purity available were obtained from Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), Acros Organics (Geel, Belgium), Iris-Biotech (Marktredwitz, Germany), Armar Chemicals (Leipzig, Doettingen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), and Alfa Aesar (Ward Hill, USA) unless otherwise indicated. The authentic reference material N^6 -carboxymethyl lysine (CML),¹⁰ N^6 -glycolyl lysine (GALA),¹¹ glyoxal lysine amide (GOLA),¹¹ glyoxal lysine dimer (GOLD),¹¹ Amadori products of glucose and N^2 -*t*-Boc-lysine,¹⁰ N^2 -*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester (1),¹² (tetrahydro-2H-pyran-2-ylxy)acetic acid (2),¹¹ and *t*-butyl- N^2 -*t*-Boc-[(N^6 -tetrahydro-2H-pyran-2-ylxy)acetyl]lysinate (3)¹¹ were synthesized according to the literature.

Synthesis of N^1, N^2 -Bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-acetamidine (GLA). A total of 316.6 mg (0.69 mmol) of (3) was dissolved in 10 mL of dry dichloromethane under an argon atmosphere, and 78.7 mg (0.41 mmol, 0.6 equiv) of triethylxonium tetrafluoroborate in 2 mL of dry dichloromethane was added dropwise under vigorous stirring on ice. The mixture was slowly warmed to room temperature and stirred overnight. After 16 h, 208.4 mg (0.69 mmol, 1 equiv) of (1) in 2 mL of dry dichloromethane was added and the reaction was continued at room temperature for 24 h under argon. Then, solvents were evaporated to dryness and 3 mL of water was added. The mixture was made strongly basic with 3 mL of 5 M sodium hydroxide solution, and the insoluble product (4) was extracted with 3 × 4 mL of ethyl acetate. The organic layer was dried over sodium sulfate, and solvents were removed in vacuum. The residue was dissolved in acetone/6 M hydrochloric acid (1:1, v/v) and stirred for 1 h at room temperature to remove the protection groups. Volatiles were evaporated, and the crude mixture was purified by column chromatography (Lichoprep RP C18, water/methanol 75:15 (v/v) + 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid (HFBA)). Materials with R_f 0.25 (silica gel 60, *n*-butanol/acetic acid/pyridine/water, 4:3:3:2, staining with ninhydrine) were combined and subjected to preparative HPLC (VYDAC 218TP1022, 250 × 20 mm, RP18, 10 μ m, isocratic water/methanol 75:15 + 1.2 mL/L HFBA). Fractions containing GLA (t_R , 23–32 min) were combined and instantly concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was lyophilized several times to yield (5) as a colorless foam (33.2 mg, 0.035 mmol, 5%, GLA-3 heptafluorobutyrate salt).

Stability of Authentic Reference Standards. Samples containing 240 μ g of bovine serum albumin (BSA) were spiked with an AGE-mixture containing CML, GALA, GOLA, GOLD, and GLA. In general, reduction and hydrolysis were done as described below, but downscaled volumes of acid and buffers solutions were used. For control, the AGE-mixture was added to separately hydrolyzed BSA proteins afterward.

Aerated Incubations. The 40 mM N^2 -*t*-Boc-lysine and 40 mM glyoxal, 40 mM glycolaldehyde (GA), or 100 mM glucose, ribose, lactose, maltose, and Amadori products (glucose-lysine) were incubated in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 37 °C in a shaker incubator (New Brunswick Scientific, Nürtingen, Germany). Aliquots were taken at different points of time and frozen instantly at –20 °C. Before analysis, samples were dissolved in 3 M hydrochloric acid and kept for 30 min at room temperature. The acid solvent was removed in a vacuum concentrator (Savant-Speed-Vac Plus SC 110 A combined with a Vapor Trap RVT 400, Thermo Fischer Scientific,

Bremen, Germany), and the residue was resuspended and filtered through a 0.45 μ m cellulose acetate Costar Spin-X filter (Corning Inc., Corning, NY). Samples were diluted appropriately and subjected to HPLC–MS/MS. For incubation at pH 4.5 and 9.6, the pH of phosphate buffer was adjusted using 0.1 M HCl or NaOH.

Deaerated Incubations. In general, incubations were done as conducted above. Deaeration was achieved by adding 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid and flushing the solution with helium for 15 min before incubation under an argon atmosphere.

Protein Incubations. A total of 6 mg of BSA, casein, β -lactoglobuline, or α -lactalbumine was incubated with 50 mM glyoxal in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 7 days under aeration. Proteins were precipitated by adding 50% trichloroacetic acid (TCA) to a final concentration of 10%. The resulting pellets were washed with 5% TCA and cold acetone and subsequently lyophilized. Proteins were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 10 mM phosphate) to an end concentration of 3 mg/mL, and aliquots were subjected to acid and enzymatic hydrolysis.

Protein Workup of Food. Proteins from food samples were analyzed as previously described.²⁰ Briefly, 5 g of defatted minced butter biscuits were extracted with 50 mL of isopropanol/water (1:1, v/v) containing 0.5% thioglycerol for 3 h under reflux. The mixture was centrifuged, and the supernatant was carefully removed. The extraction step was repeated once. Both extracts were combined, and proteins were precipitated overnight at –18 °C in a freezer. The crude protein pellets were washed two times with cold water and were suspended in 15 mL of water. A total of 100 μ L (144 kU) of heat-stable α -amylase was added, and the reaction was heated to reflux for 30 min. Afterward, the reaction was cooled down to 60 °C and 500 μ L of amyloglucosidase solution (130 U) was added prior to incubating for additionally 30 min at 60 °C. The reaction was stopped by cooling to room temperature, and proteins were precipitated by adding 15 mL of –20 °C ethanol overnight in a freezer. The protein pellet was carefully washed two times with water and subsequently lyophilized. A total of 3 mg of the resulting protein powder was suspended in 1 mL of PBS and subjected to acid hydrolysis as described above.

Enzymatic Hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was done as previously described by Baldensperger et al.²¹ Briefly, aliquots of protein samples (500 μ L) were digested with a mixture of enzymes containing pronase E (0.3 U, two additions), leucine aminopeptidase (1.0 U), and carboxypeptidase Y (0.95 U). Enzymes were added stepwise, and incubation of each was performed for 24 h in a shaker incubator at 37 °C. To prevent microbial growth during incubation, a small crystal of thymol was added with the first addition of enzyme. After completion of the digestion procedure, the reaction mixture was filtered through a 3000 Da molecular weight cutoff filter (VWR International, Radnor, PA). Filtrates were appropriately diluted with highly purified water before injection into the HPLC–MS/MS system.

Acid Hydrolysis. Aliquots of protein samples (200 μ L) were placed in a screw-cap vial and solvents were removed in a vacuum concentrator. The residue was dissolved in 400 μ L of degassed 6 M hydrochloric acid and hydrolyzed at 110 °C for 20 h. Afterward, the acid was removed in a vacuum concentrator and the residue was diluted with 0.05 M hydrochloric acid before subjecting to HPLC–MS/MS analysis. Acid hydrolysis with prior reduction was done as described above, but protein solutions were incubated with 50 μ L of sodium borohydride solution (15 mg/mL in 0.01 M NaOH) for 1 h at room temperature before adding the acid.

Analytical HPLC–MS/MS. The HPLC system (Jasco, Groß-Umstadt, Germany) consisted of a pump (PU-2080), a degasser (LG-2080-02), a quaternary gradient pump (LG-2080-04), a column oven (Jasco Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on a API 4000 QTrap LC-MS/MS system (AB Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion spray source using electrospray ionization (ESI) in positive mode (sprayer capillary voltage of 2.5 kV, nebulizing gas flow of 70 mL min^{–1}, heating gas of 80 mL min^{–1} at 650 °C, curtain gas of 40

Table 1. Mass Spectrometric Parameters for AGE Quantitation

AGE	retention time (min)	precursor ion		product ion 1 ^a			product ion 2 ^b			product ion 3 ^b		
		<i>m/z</i> (amu)	DP ^c (V)	<i>m/z</i> (amu)	CE ^d (eV)	CXP ^e (V)	<i>m/z</i> (amu)	CE (eV)	CXP (V)	<i>m/z</i> (amu)	CE (eV)	CXP (V)
CML	6.3	205.2	42	84.1	30.0	14.0	130.0	17.0	9.0	56.1	59.0	9.0
GALA	7.2	205.2	40	142.1	20.0	11.0	84.1	36.0	14.0	159.1	15.0	10.0
GOLA	35.8	333.2	45	169.1	26.0	12.0	84.1	54.0	13.0	130.0	32.0	9.0
GLA	37.2	333.2	85	157.1	29.0	10.0	84.1	45.0	14.0	130.0	35.0	6.5
GOLD	38.6	327.2	60	84.1	51.0	13.0	282.3	31.0	14.0	198.1	28.0	14.0

^aMRM transition used for quantification. ^bMRM transition used for confirmation. ^cDeclustering potential. ^dCollision energy. ^eCell exit potential.

Table 2. LOD and LOQ of AGE in N²-*t*-Boc-Lysine Incubations and in Protein Hydrolysates

analyte	N ² - <i>t</i> -Boc-lysine incubations ^a		protein hydrolysate ^b	
	LOD (mmol/mol lysine)	LOQ (mmol/mol lysine)	LOD (mmol/mol lysine)	LOQ (mmol/mol lysine)
CML	0.0007	0.0022	0.0014	0.0041
GALA	0.0003	0.0008	0.0005	0.0015
GOLA	0.0083	0.0249	0.0184	0.0552
GLA	0.0007	0.0020	0.0028	0.0085
GOLD	0.0007	0.0022	0.0008	0.0026

^a40 mM N²-*t*-Boc-lysine, 40 mM glyoxal, 100 mM phosphate. ^b6 mg/mL protein, 50 mM glyoxal, 100 mM phosphate.

mL min⁻¹). Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (VYDAC 218TP54, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 μm, Hesperia, CA) using a flow rate of 1.1 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 2% B (0–7.5 min) to 23% B (40 min) to 100% B (44–53 min) to 2% B (58–72 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 1.2 mL/L HFBA was added. The optimized mass spectrometric parameters of the analytes are summarized in Table 1. Quantitation was based on the standard addition method. More specifically, increasing concentrations of authentic reference standards at factors 0.5, 1, and 2 times of the concentration of the analyte in the sample were added to aliquots of the sample. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 9, respectively (Table 2).

Analytical HPLC-FLD. For determination of the amino acids lysine and phenylalanine, a Jasco HPLC system was used, which consisted of a pump (PU-2080 Plus), a degasser (DG-2080-54), a quaternary gradient pump (LG-2080-04), a fluorescent detector (FP-2020 Plus), a column oven (Jasco Jetstream II), and an autosampler (AS-2055 Plus). Chromatographic separation was performed on the same stainless steel column as described above using a flow rate of 1.0 mL/min at 25 °C. Diluted samples were injected at 2% B (0–5 min) to 90% B (35 min) to 100% B (36–41 min) to 2% B (45–50 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 1.2 mL/L HFBA was added. For fluorescence detection, a post column reagent was added at a flow rate of 0.5 mL/min. This reagent consists of 800 mg of *o*-phthalaldehyde, 2 mL of mercaptoethanol, and 1 g of Brij L23 in 0.4 M borate buffer (24.73 g of boric acid in 1 L of ultrapure water was adjusted to pH 9.7 with KOH). The fluorescent detector was attuned to 340 nm for excitation and 455 nm for emission. Retention times were *t*_R = 8.7 min for lysine and *t*_R = 22.5 min for phenylalanine. Quantitation was done by external calibration using authentic amino acid standards. The amount of lysine in samples, which were incubated with glyoxal, was calculated using phenylalanine as an internal standard. More precisely, the ratios of lysine/phenylalanine of unmodified protein samples were used to determine the lysine concentration in each glycated protein sample.

Enrichment of Analytes and Collision-Induced Dissociation. Protein hydrolysates and N²-*t*-Boc-lysine incubations up to 20 μL were repetitively injected into the above analytical HPLC system, and the chromatographic separation was performed as described for HPLC-FLD. Eluents from the column were collected without post

column derivatization using a CHF122SB fraction collector (Advantec MFS, Dublin, USA). Fractions containing GLA were combined using a vacuum concentrator. Samples were concentrated by a factor of five and subsequently injected into HPLC–MS/MS as described above. The collision-induced dissociation (CID) setup was as follows: the declustering potential was 85 V, the further parameters collision energy (CE) and cell exit potential (CXP) were changed with different *m/z* values in order to get the optimal ion yields for individual GLA fragments (*m/z* (CE/CXP); 50–149 (42 eV/7 V); 150–299 (28 eV/10 V); 300–350 (25 eV/10 V)).

High-Resolution Mass Spectra Determination (HR-MS). Positive ion high-resolution electrospray ionization (ESI) mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a heated ESI electrospray ion source (spray voltage of 3.5 kV, capillary temperature of 275 °C, source heater temperature of 40 °C, FTMS resolution of >30,000). Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μL Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μL/min. The instrument was externally calibrated by Pierce LTQ Velos ESI positive ion calibration solution (product number 88323, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL 61105, USA). The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1. The higher-energy collision dissociation (HCD) mass spectra were recorded at a normalized collision energy of 40%.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. NMR spectra were recorded on a VXR 400 spectrometer (Varian, Palo Alto, U.S.A.) operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Analysis of AGE concentrations were all performed in triplicates, which resulted in coefficients of variation less than 10% for AGE concentrations unless otherwise indicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of N¹,N²-Bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-acetamide (GLA). GLA was synthesized from N²-*t*-Boc-N⁶-Cbz-lysine in a five-step synthesis (Figure 1). First, the carboxylic acid was protected as the corresponding *t*-butyl ester. Then, the N⁶-benzyloxycarbonyl group was hydrogenolytically removed to yield the N²-*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester (1) bearing a free N⁶-amine group as previously described.¹² The alcohol group of glycolic acid was protected as the tetrahydropyranyloxy derivative in order to prevent side reactions and subsequently coupled with (1) using carbon-

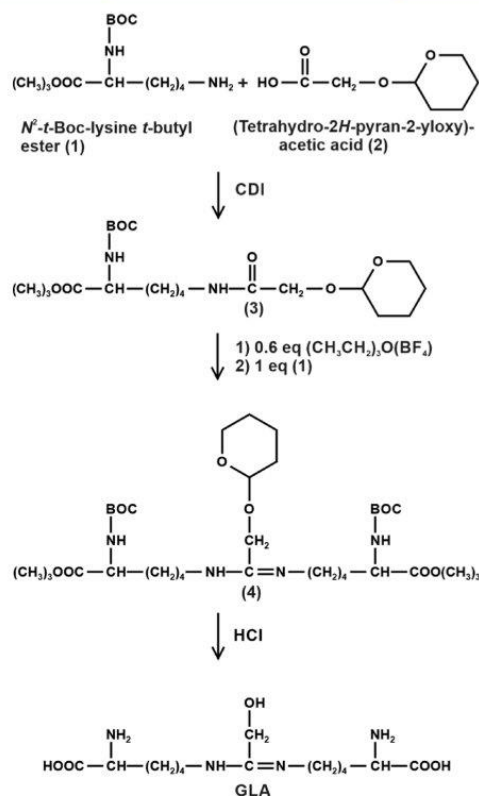


Figure 1. Synthesis of GLA.

yldiimidazol (CDI) as an activation agent to yield (*t*-butyl-*N*²-*t*-Boc-[(*N*⁶-tetrahydro-2*H*-pyran-2-yloxy)acetyl]lysinate) (3) under mild conditions. In the next step, oxygen of the amide bond was alkylated with triethylxonium tetrafluoroborate forming an imidate salt *in situ*, which is accessible to nucleophiles. In a second step, the imidate salt was reacted with the *N*⁶-amine group of (1) forming the amidine component (4). The elemental composition of the reaction product was confirmed by HR-MS (m/z 729.4996 (found), 729.5014 calculated for $\text{C}_{37}\text{H}_{69}\text{O}_{10}\text{N}_4^+ [\text{M} + \text{H}]^+$). After acid hydrolysis of the protection groups, free GLA was easily separated from the reaction byproducts GALA and lysine by ion pair chromatography with heptafluorobutyric acid on a C18 reverse phase. The elemental composition of GLA was verified by HR-MS experiments in positive mode (m/z 333.2125 $[\text{M} + \text{H}]^+$) (m/z 333.2138 calc. for $\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_3\text{N}_4^+$). The fragmentation pattern of GLA in MS/MS experiments (Figure 2) was substantiated by the elemental composition of the most abundant fragment ions by higher-energy collision-induced dissociation HR-MS, as shown in the Supporting Information (Figure SI-1). The final structural verification was achieved using ¹H- and ¹³C-NMR and homonuclear correlation spectroscopy (H,H-COSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques. Table 3 summarizes the ¹H- and ¹³C-NMR data of GLA. In general, ¹H and ¹³C

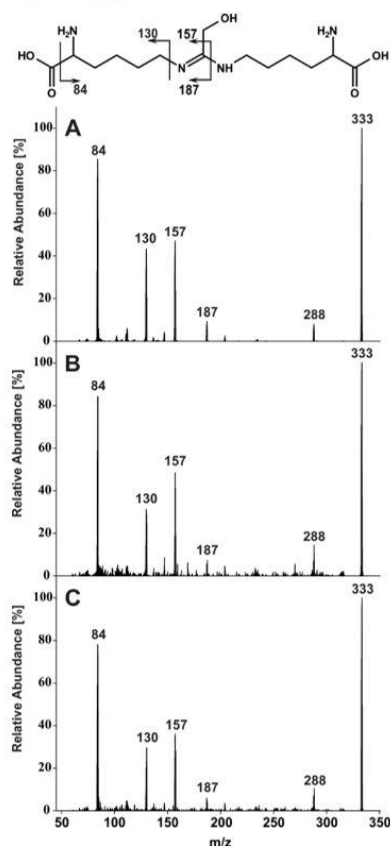
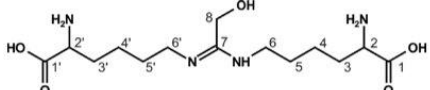


Figure 2. Verification of GLA by collision-induced dissociation (CID) of m/z 333 ($\text{M} + \text{H}$)⁺: (A) authentic reference standard, (B) enriched enzymatic hydrolysis of BSA-glyoxal incubation, and (C) enriched acid hydrolysis of a biscuit protein sample.

signals of the lysine backbone were in line with previously published NMR data of glycated lysine derivatives.²² Even though GLA is a symmetrical cross-link structure, the amine and imine side can be distinguished by different chemical shifts. While carbon signals of 1/1'-3/3' were leading to identical signals in ¹³C-NMR, carbon atoms near to the amidino group (atoms 4–6) showed different resonances. Furthermore, the methylene protons 6 and 6' adjacent to the amidino group can be distinguished in ¹H-NMR with two distinct triplets at 3.18 and 3.23 ppm, respectively, in a ratio of about 1:1. Generally, prototropic tautomerism between the amine and imine nitrogen leads to coalescent signals of the side chains in ¹H- and ¹³C-NMR spectra, however, which is abrogated in the presence of acids.²³ As GLA was synthesized as a heptafluorobutyric salt, the amidino group was protonated and tautomerism during NMR recording was absent.

Chemical Characterization of GLA. The easiest method to release bound AGEs during complete hydrolysis of proteins involves both high concentration of acid and temperature (6 M HCl, 110 °C, 20 h). However, under these harsh conditions, artificial formation of *N*⁶-carboxymethyl lysine (CML) from degradation of Amadori products was reported, which leads to

Table 3. High-Resolution Mass and ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopic Data of GLA (in D₂O)


C/H	δ ¹ H [ppm]	δ ¹³ C [ppm]
1,1'		172.7
2,2'	3.86 (t, 2H) ³ J = 6.3 Hz	53.2
3,3'	1.83 (m, 4H)	29.5
4, 4'	1.36 (m, 4H)	21.5, 21.4
5,5'	1.58 (m, 4H)	28.2, 26.3
6	3.18 (t, 2H) ³ J = 7.4 Hz	40.9
6'	3.23 (t, 2H) ³ J = 7.0 Hz	41.8
7		164.7
8	4.43 (s, 2H)	56.7
HR-MS [M + H] ⁺ (m/z)		333.2125
calc. C ₁₄ H ₂₉ O ₅ N ₄ ⁺ (m/z)		333.2138

an increase in analytical results, while especially, amid-AGEs are completely degraded.¹⁰ A common approach to handle artifact CML formation is the reduction of the Amadori products using excess of sodium borohydride (NaBH₄) before acid hydrolysis.²⁴

To test the stability of GLA under conditions of acid hydrolysis, the authentic reference standard was heated at 110 °C in 6 M hydrochloric acid for 4–48 h and analyzed using HPLC-FLD with *o*-phthalaldehyde post column derivatization. However, even after 48 h, no degradation of GLA was observed. The stability of the amidine bond toward acid-catalyzed hydrolysis was shown in the literature to be highly dependent on the nitrogen substitution, where longer-chained alkylations lead to mesomeric stabilized protonated amidinium cations.²⁵ Thus, an *N,N'*-dialkylated poly-amidine structure, similar to the present GLA, proved to be stable to hydrolysis for several weeks in acidic medium.²⁶ On the other hand, alkylation also enhances the electrophilic character of the amidine carbon atom, which facilitates easy alkaline hydrolysis. This reactivity also explains the susceptibility to reduction. In the case of GLA, reaction with NaBH₄ led to lysine and *N*⁶-(2-hydroxyethyl)lysine, which were verified by comparing retention times and mass spectrometric fragmentation patterns with authentic reference standards.²⁷ These findings were in line with results found in the literature describing the reduction of *N,N'*-disubstituted amidines with NaBH₄ to give mono-alkylated amine structures.^{28,29} To validate these results for the present protein matrix, authentic reference standards CML, *N*⁶-glycolyl lysine (GALA), GLA, glyoxal lysine amide (GOLA), and glyoxal lysine dimer (GOLD) were added to native BSA and subjected to the standard acid hydrolysis protocol alternatively with and without prior NaBH₄ reduction. The recovery rates of AGEs were determined by adding authentic standards after BSA hydrolysis. As shown in Table 4, GLA was markedly decreased to 40% during reduction, while without reduction, the amidine was fully recovered. As expected, neither CML nor GOLD was influenced by the addition of NaBH₄ and showed unaltered values. In contrast, amide structures GALA and GOLA were always quantitatively

Table 4. Stability of AGEs during Acidic Protein Hydrolysis

pretreatment	relative concentration of authentic reference standards [%]				
	CML	GALA	GOLA	GLA	GOLD
no reduction	101 ± 4	<LOD	<LOD	96 ± 3	100 ± 2
reduction	96 ± 5	<LOD	<LOD	40 ± 4	102 ± 3

hydrolyzed under strong acidic conditions. Thus, protein-bound GLA must be analyzed after acid hydrolysis without prior NaBH₄ reduction.

Formation of GLA in *N*²-*t*-Boc-Lysine Reaction Mixtures with Glyoxal and Other Sugars. The reaction of glyoxal with *N*²-*t*-Boc-lysine initially leads to labile glyoxal-imines, which are readily accessible for further nucleophilic reactions with both water and lysine.¹¹ As shown in Figure 3, the addition of water at the free carbonyl group gives hydrate (1), which rearranges to give CML by isomerization. Analogously, the addition of lysine toward hemiaminal (2) stabilizes to cross-link GOLA. In contrast, addition of water (3) and lysine (4) at the imine moiety initiates formation of GALA and GLA, respectively. While amides GALA and GOLA were already established to be part of this CML-isomerization cascade not only in model reactions but also in foods and *in vivo*, amidine formation is so far not known in the Maillard chemistry field.^{11,20,30} Amidine lysine cross-link formation was proposed by Gupta et al. to occur during self-inactivation of fructose-1,6-bisphosphate aldolase via a 1,2-hydride shift of a geminal diamine intermediate.³¹ Interestingly, the glyoxal-derived imidazoline cross-link (GODIC) was proposed by Lederer and Klaiber to be formed by the reaction of glyoxal-imines with arginine via a geminal diamine through a similar intramolecular redox process.¹⁴ However, from today's perspective, hydride shifts in aqueous media at neutral pH are highly unlikely, instead the isomerization mechanism described was established, which basically leads to the same results.

To gain evidence for GLA formation, *N*²-*t*-Boc-lysine and glyoxal were incubated under physiological conditions for up to 7 days at pH 7.4. Using a highly sensitive HPLC-MS/MS method, we were indeed able to confirm GLA as a novel glyoxal-derived AGE for the first time by comparing retention time and characteristic mass transitions with the authentic reference standard. As shown in Figure 4, concentrations of all AGEs increased in a time-dependent manner. Under these conditions, GLA was formed only in small amounts, reaching 0.009 mmol/mol lysine compared with 18 mmol/mol lysine CML after 7 days. However, the ratio of CML/GALA (18:1) was similar to GOLA/GLA (22:1), indicating the favored addition of nucleophiles at the carbonyl compared to the imine moiety. Furthermore, the ratios of CML/GOLA (90:1) and GALA/GLA (106:1) show that only small amounts of cross-link structures are formed, in contrast to the monovalent equivalents, which is consistent with the relatively low concentration of lysine (40 mM) compared to the excess of water in the aqueous incubation solutions.

Incubation of *N*²-*t*-Boc-lysine and glyoxal under aeration versus deaeration gave comparable amounts of CML, GALA, GOLA, GOLD, and GLA and confirmed the proposed non-oxidative formation pathway via glyoxal-imines. To underline that the formation of GLA is exclusively derived from glyoxal-imine, *N*²-*t*-Boc-lysine was incubated with glycolaldehyde (GA) at pH 7.4 for 7 days under oxidative and non-oxidative conditions. GA has been shown to be almost quantitatively

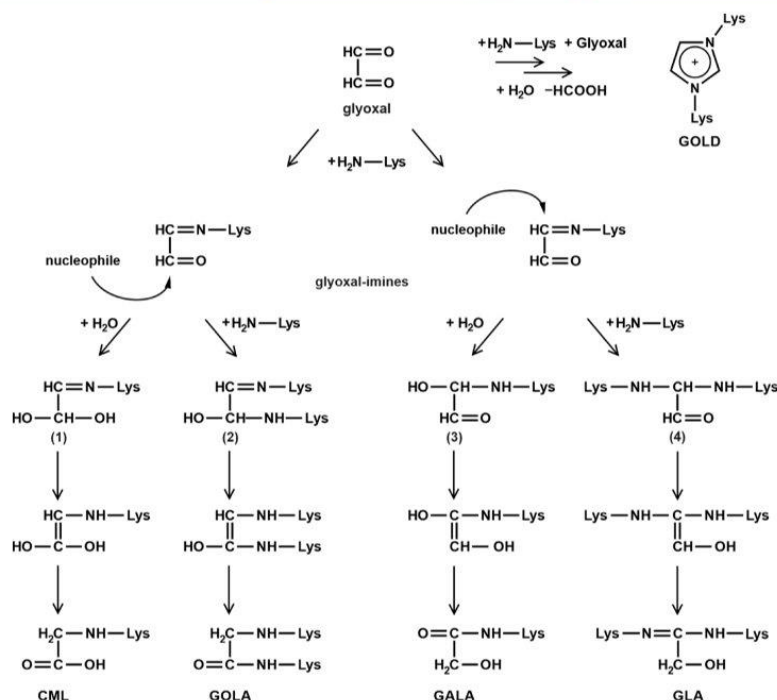


Figure 3. Proposed formation of AGEs resulting from the reaction of glyoxal with lysine.

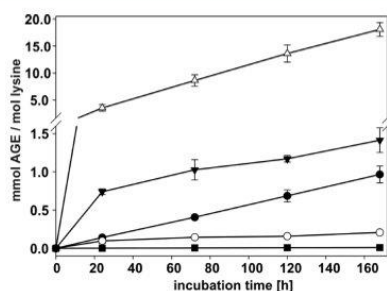


Figure 4. Formation of AGEs in N^2 -*t*-Boc-lysine incubation with glyoxal at 37 °C and pH 7.4 under aeration: CML (open up triangles), GOLD (solid down triangles), GALA (solid circles), GOLA (open circles), and GLA (solid squares).

oxidized to glyoxal under lysine-catalyzed Maillard conditions.²⁷ Thus, as expected with GA as a precursor, GLA was only formed under aeration, reaching up to about 0.002 mmol/mol lysine, while under deaeration, no amidine was detectable.

Furthermore, concentrations of all AGEs in the N^2 -*t*-Boc-lysine glyoxal incubations were highly dependent on the pH value, which correlates with the reactivity of the N^6 -amino group of lysine changing with protonation. Consequently, at pH 9.6, concentrations increased for GLA to 0.035 mmol/mol lysine and for CML to 50 mmol/mol lysine, while at pH 4.5, only traces of CML were found and GLA was below LOD.

To gain evidence for GLA formation during the Maillard-induced breakdown of sugars, different carbohydrates were

incubated for 21 days under the same conditions as described above. As summarized in Table 5, GLA was formed only in

Table 5. Formation of GLA and CML in N^2 -*t*-Boc-Lysine Incubations for 21 Days with Different Sugars at 37 °C and pH 7.4 under Aeration

sugar	concentration	
	mmol/mol lysine	μ mol/mol lysine
glucose	6.6 ± 0.4	0.41 ± 0.03 ^a
ribose	46.5 ± 0.3	3.31 ± 0.27
maltose	2.6 ± 0.3	0.19 ± 0.11 ^a
lactose	1.0 ± 0.6	0.12 ± 0.06 ^a
Amadori product	51.3 ± 1.8	0.09 ± 0.03 ^a

^aAfter HPLC enrichment.

concentrations between 0.0001 and 0.0033 mmol/mol. In general, the monosaccharides glucose and ribose led to higher yields of GLA, reaching up to 0.0004 and 0.0033 mmol/mol lysine. Comparing glucose with maltose and lactose, the reactivity of disaccharides with respect to AGE formation was one-fourth and one-half, respectively. The most reactive sugar ribose led to about one-third of the concentration of GLA compared to 7 days of glyoxal lysine incubation. This indicates that the formation of GLA strongly depends on the formation of glyoxal during the breakdown of sugars. It was previously shown that less glyoxal is formed by fragmentation of disaccharides compared to monosaccharides, which is in support to GLA formation via glyoxal-imines.³² Different

Table 6. Formation of AGEs during Incubation of Different Proteins with Glyoxal for 7 Days at pH 7.4 and 37 °C under Aeration

protein	concentration AGE [mmol/mol lysine]				
	CML ^a	GALA ^b	GOLA ^b	GLA ^a	GOLD ^a
BSA	130 ± 20	10 ± 2	2.4 ± 0.4	0.26 ± 0.04	6.9 ± 0.6
casein	150 ± 10	n.d. ^c	n.d.	0.22 ± 0.01	2.5 ± 1.1
α -lactalbumine	180 ± 20	n.d.	n.d.	0.71 ± 0.02	4.8 ± 0.2
β -lactoglobuline	220 ± 10	n.d.	n.d.	1.06 ± 0.07	7.2 ± 1.5

^aAcid hydrolysis. ^bEnzymatic hydrolysis. ^cn.d., not determined.

pathways of glyoxal formation during the fragmentation of sugars including the retro-aldol reaction and hydrolytic β -fragmentation were proposed, but clear mechanistic evidence is still missing.^{33–35}

Generally, the formation of CML correlated with the different reactivity of sugars as described for GLA. However, comparing formation of CML derived by reactions of lysine with glyoxal and ribose, the latter led to 46 mmol/mol lysine whereas incubation of glyoxal with lysine yielded only about one-third. This is explained by the alternative formation of CML via additional oxidative fragmentation pathways from Amadori products, which is also true for the formation of amide cross-link GOLA.¹⁰ Further support gave the direct incubation of the Amadori product of glucose and lysine, where CML reached 51 mmol/mol lysine, about 8 times more compared to glucose alone. On the other hand, there was a significant decline for GLA. Thus, an oxidative fragmentation pathway of GLA must be excluded and the formation of GLA has to be solely ascribed to glyoxal-imine reactions.

Formation of AGEs in Glyoxal Protein Incubations.

Different proteins (BSA, casein, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin) were incubated with glyoxal at pH 7.4 and 37 °C. The quantitation of amide AGEs GALA and GOLA was done after enzymatic hydrolysis.¹¹ One drawback of using enzymes is that only a partial hydrolysis of proteins is achieved. Therefore, the efficiency of each single hydrolysis was generally accessed by a parallel acid hydrolysis using CML as a stable AGE. To verify the identity of formed GLA and to exclude any artifact formation caused by acid hydrolysis, CID measurements from enzymatic hydrolysis were compared to the authentic standard. As shown in Figure 2B, both mass spectra were virtually identical.

To cope for the different lysine concentrations of the proteins, the AGE content was normalized for lysine content of unmodified proteins (Table 6). Based on the structures of CML, GLA, and GOLD, it can be concluded that lysine residues of BSA, casein, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin are generally glycated in a rising degree. The different proteins vary in size, molecular structure, isoelectric point, and their ratio of lysine to other amino acids. While BSA has a molecular weight of about 66 kDa, the other proteins casein, α -lactalbumin, and β -lactoglobulin are much smaller, ranging from 14 to 25 kDa.³⁶ Several factors, including the accessibility of lysine residues (exposed to the surface or buried), the pK value of single lysine residues, and the catalytic power of the microenvironment, were proposed to explain site-specific glycation of proteins and, thus, the relative extent of glycation.³⁷

From a mechanistic point of view, the protein microenvironment based either on the amino acid sequence or the 3D structure can lower the pK value of single lysine residues, accelerate chemical reactivity by deprotonation, and thus

facilitate nucleophilic reactions to form imin-structures.³⁸ Specifically, for Amadori products, neighboring amino acids were reported to catalyze Amadori rearrangement reactions, which should also account for the present glyoxal-lysine imine isomerization.^{38,39} Cardoso et al. showed that glycation of whey proteins α -lactalbumin and β -lactoglobulin was nearly twice that of β -casein in quasi-dry state incubations with various sugars, which is in line with the results of Zhao et al., where β -lactoglobulin gave higher CML yields compared to β -casein when both species were incubated with glyoxal.^{40,41} In contrast, Krämer and Davies quantitated cross-link MOLD in incubations of methylglyoxal with β -lactoglobulin and α -lactalbumin to be not statistically different.⁴² However, comparing the present results with the literature is challenging because the extent of lysine modifications often referred to protein weight instead of lysine content as herein.

Nevertheless, with respect to incubations of glyoxal with *N*²-*t*-Boc-lysine, GLA formation was generally favored in the protein matrix, reaching up to 0.1 mol % GLA compared with 0.0009 mol % in lysine incubation. This finding is in line with the changed ratio of monovalent to the cross-link structure in incubation of glyoxal with lysine compared with BSA. In the latter, the ratios of CML/GOLA (54:1) and GALA/GLA (38:1) indicate that the cross-link structures were favored in the protein matrix by a factor of about two and three, respectively.

Detection of GLA in Food Proteins. To evaluate the formation of GLA during food processing, a bakery product was chosen as during baking at high temperatures, AGE formation is favored.²⁰ After defatting, proteins of minced butter biscuits were extracted with hot water/isopropanol mixtures and the crude protein pellet was subjected to enzymatic starch hydrolysis. Proteins were precipitated and acid-hydrolyzed as described above. To improve the signal-to-noise ratio, fractions with GLA were combined and concentrated via repetitive injections in an analytical HPLC system and then subjected to HPLC–MS/MS. Here, we report for the first time the existence of GLA in the food matrix, which was unequivocally proven by comparison of retention times and mass spectrometric fragmentation patterns with the authentic reference standard as shown in Figure 2C to give virtual identical CID-spectra.

In contrast to several reports on quantitation of Maillard-derived cross-link structures in tissue proteins, analyses in food proteins are rare in the literature.^{4–6,43,44} In snack products, the bicyclic cross-link structures pentosidine and glucosepan, imidazolium-type cross-links GOLD and MOLD, and amino-imidazolium structures GODIC, methylglyoxal-derived imidazoline cross-link (MODIC), and 3-deoxyglucosone-derived imidazoline cross-link (DODIC) were found at concentrations between 16 and 151 mg/kg protein.^{16,19} Otherwise, DODIC and methylglyoxal lysine amide (MOLA)

were recently quantitated as the only bivalent structures in wheat bread rolls at 4.75 and 2.03 mg/kg protein, respectively.²⁰ Interestingly, in snacks, GOLD and MOLD were found to be a factor of 5–10 times lower compared to GODIC and MODIC.¹⁹ This was in support of mechanistic studies based on model systems similar to the present setup, which showed that imidazolium-type cross-links are only favored at a high ratio of glyoxal to lysine.¹¹ While the concentration of glyoxal in the real food matrix is significantly lower, other Maillard-derived cross-link structures as the present amidine-type GLA might thus be much more important.

In summary, we succeeded to establish the amidine moiety as a novel lysine–lysine cross-link within the Maillard reaction scheme. As a first representative, GLA was unequivocally established not only in Maillard protein mixtures but also in food proteins. Thus, the isomerization-based CML reaction cascade starting from lysine and glyoxal was extended to amidine bivalent lysine cross-links. Ongoing research will now clarify the quantitative relevance in processed food proteins and also *in vivo*.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c02792>.

(Figure SI-1) Verification of the fragmentation pattern of GLA by HR-MS; (Figure SI-2) structures of selected advanced glycation end products; (Figure SI-3) HPLC–MS/MS-chromatogram of authentic reference standards and protein hydrolysates; (Figure SI-4) ¹H- and ¹³C-NMR spectra of GLA in D₂O; (Figure SI-5) total ion HPLC–MS/MS-chromatogram of authentic reference standards and enriched butter biscuits; and (Table SI-1) influence of pH values on the formation of CML and GLA during incubations of glyoxal with N²-*t*-Boc-lysine under aeration (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale 06120, Germany; orcid.org/0000-0001-8826-0808; Email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: ++049-345-5527341

Author

Michael D. Eggen – Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Halle/Saale 06120, Germany

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.1c02792>

Funding

Funding was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Germany) Research Training Group 2155-2, ProMoAge.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording the NMR spectra and Dr. A. Frolov and A. Laub from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS USED

AGE, advanced glycation end products; BSA, bovine serum albumin; CDI, 1,1'-carbonyldiimidazole; CID, collision induced dissociation; CML, N^ε-carboxymethyl lysine; GO, glyoxal; DODIC, 3-deoxyglucosone-derived imidazoline cross-link; DOLD, 3-deoxyglucosone lysine dimer; 3-DG, 3-deoxyglucosone; GA, glycolaldehyde; GLA, N¹,N²-bis-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-acetamide; GALA, N^ε-glycolyl lysine; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link; GOLD, glyoxal lysine dimer; GOLA, glyoxal lysine amide; MGO, methylglyoxal; MOLA, methylglyoxal lysine amide; MOLD, methylglyoxal lysine dimer; MODIC, methylglyoxal-derived imidazoline cross-link

■ REFERENCES

- (1) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53*, 10316–10329.
- (2) Mottram, D. S.; Wedzicha, B. L.; Dodson, A. T. Acrylamide Is Formed in the Maillard Reaction. *Nature* **2002**, *419*, 448–449.
- (3) Ledl, F.; Schleicher, E. New Aspects of the Maillard Reaction in Foods and in the Human Body. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 565–594.
- (4) Frye, E. B.; Degenhardt, T. P.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Role of the Maillard Reaction in Aging of Tissue Proteins. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18714–18719.
- (5) Nagaraj, R. H.; Shipanova, I. N.; Faust, F. M. Protein Cross-Linking by the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 19338–19345.
- (6) Odani, H.; Shinzato, T.; Usami, J.; Matsumoto, Y.; Brinkmann Frye, E.; Baynes, J. W.; Maeda, K. Imidazolium Crosslinks Derived from Reaction of Lysine with Glyoxal and Methylglyoxal Are Increased in Serum Proteins of Uremic Patients: Evidence for Increased Oxidative Stress in Uremia. *FEBS Lett.* **1998**, *427*, 381–385.
- (7) Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Dicarbonyl Stress in Cell and Tissue Dysfunction Contributing to Ageing and Disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 221–226.
- (8) Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard Reaction under Physiological Conditions. *Glycoconjugate J.* **2016**, *33*, 499–512.
- (9) Poulsen, M. W.; Hedegaard, R. V.; Andersen, J. M.; de Courten, B.; Bügel, S.; Nielsen, J.; Skibsted, L. H.; Dragsted, L. O. Advanced Glycation Endproducts in Food and Their Effects on Health. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *60*, 10–37.
- (10) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10017–10026.
- (11) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638–41647.
- (12) Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3957–3965.
- (13) Skovsted, I. C.; Christensen, M.; Breinholt, J.; Mortensen, S. B. Characterisation of a Novel AGE-Compound Derived from Lysine and 3-Deoxyglucosone. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **1998**, *44*, 1159–1163.
- (14) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes: Characterization and Detection of Lysine–

Arginine Cross-Links Derived from Glyoxal and Methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507.

(15) Biemel, K. M.; Reihl, O.; Conrad, J.; Lederer, M. O. Formation Pathways for Lysine-Arginine Cross-Links Derived from Hexoses and Pentoses by Maillard Processes. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 23405–23412.

(16) Henle, T.; Schwarzenbolz, U.; Klostermeyer, H. Detection and Quantification of Pentosidine in Foods. *Z. Lebensm. Forsch. A* **1997**, *204*, 95–98.

(17) Tessier, F.; Obrenovich, M.; Monnier, V. M. Structure and Mechanism of Formation of Human Lens Fluorophore LM-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20796–20804.

(18) Lederer, M. O.; Bühler, H. P. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes—Characterization and Detection of a Lysine-Arginine Cross-Link Derived from D-Glucose. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1081–1088.

(19) Biemel, K. M.; Bühler, H. P.; Reihl, O.; Lederer, M. O. Identification and Quantitative Evaluation of the Lysine-Arginine Crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and Glucosepan in Foods. *Nahrung/Food* **2001**, *45*, 210–214.

(20) Jost, T.; Henning, C.; Heymann, T.; Glomb, M. A. *Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making*. 2021.

(21) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1898–1906.

(22) Baldensperger, T.; Di Sanzo, S.; Ori, A.; Glomb, M. A. Quantitation of Reactive Acyl-CoA Species Mediated Protein Acylation by HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 12336–12343.

(23) Sharavanan, K.; Komber, H.; Böhme, F. Synthesis and Properties of Aliphatic Polyacetamidines. *Macromol. Chem. Phys.* **2002**, *203*, 1852–1858.

(24) Soboleva, A.; Vikhnina, M.; Grishina, T.; Frolov, A. Probing Protein Glycation by Chromatography and Mass Spectrometry: Analysis of Glycation Adducts. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2557.

(25) Shriner, R. L.; Neumann, F. W. The Chemistry of the Amidines. *Chem. Rev.* **1944**, *35*, 351–425.

(26) Sharavanan, K.; Komber, H.; Fischer, D.; Böhme, F. Hydrolytic Degradation of Polyamidines and Its Potential Application in Controlled Release of Active Agents. *Polymer (Guildf.)* **2004**, *45*, 2127–2132.

(27) Henning, C.; Liehr, K.; Girdt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Analysis and Chemistry of Novel Protein Oxidation Markers in Vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 4692–4701.

(28) Okamoto, Y.; Kinoshita, T. A Direct Reductive Deamination of Amidines with Sodium Borohydride. Formation of Deaminated Compounds and Secondary Amines. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1981**, *29*, 1165–1169.

(29) Zhang, J.; Chang, H. M.; Kane, R. R. Reductive Monoalkylation of Aromatic Amines via Amidine Intermediates. *Synlett* **2001**, *5*, 643–645.

(30) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2500–2507.

(31) Gupta, S.; Hollenstein, R.; Kochhar, S.; Christen, P. Paracatalytic Self-Inactivation of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase. Structure of the Crosslink Formed at the Active Site. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 515–519.

(32) Hollnagel, A.; Kroh, L. W. Formation of α -Dicarbonyl Fragments from Mono- and Disaccharides under Caramelization and Maillard Reaction Conditions. *Z. Lebensm. Forsch. A* **1998**, *207*, 50–54.

(33) Weenen, H. Reactive Intermediates and Carbohydrate Fragmentation in Maillard Chemistry. *Food Chem.* **1998**, *62*, 393–401.

(34) 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.

(35) Smuda, M.; Glomb, M. A. Fragmentation Pathways during Maillard-Induced Carbohydrate Degradation. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 10198–10208.

(36) Farrell, H. M., Jr.; 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. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1641–1674.

(37) Oliver, C. M. Insight into the Glycation of Milk Proteins: An ESI- and MALDI-MS Perspective (Review). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2011**, *51*, 410–431.

(38) Shapiro, R.; McManus, M. J.; Zalut, C.; Bunn, H. F. Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin A. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 3120–3127.

(39) Iberg, N.; Flückiger, R. Nonenzymatic Glycosylation of Albumin in Vivo. Identification of Multiple Glycosylated Sites. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 13542–13545.

(40) Cardoso, H. B.; Wierenga, P. A.; Gruppen, H.; Schols, H. A. Maillard Induced Glycation Behaviour of Individual Milk Proteins. *Food Chem.* **2018**, *252*, 311–317.

(41) Zhao, D.; Li, L.; Le, T. T.; Larsen, L. B.; Su, G.; Liang, Y.; Li, B. Digestibility of Glyoxal-Glycated β -Casein and β -Lactoglobulin and Distribution of Peptide-Bound Advanced Glycation End Products in Gastrointestinal Digests. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 5778–5788.

(42) Krämer, A. C.; Davies, M. J. Effect of Methylglyoxal-Induced Glycation on the Composition and Structure of β -Lactoglobulin and α -Lactalbumin. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 699–710.

(43) Chellan, P.; Nagaraj, R. H. Protein Crosslinking by the Maillard Reaction: Dicarbonyl-Derived Imidazolium Crosslinks in Aging and Diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *368*, 98–104.

(44) Biemel, K. M.; Friedl, D. A.; Lederer, M. O. Identification and Quantification of Major Maillard Cross-Links in Human Serum Albumin and Lens Protein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 24907–24915.

10.2 Publikation 2 *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (50), 15374–15383

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

pubs.acs.org/JAFC

Article

Analysis of Glyoxal- and Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products during Grilling of Porcine Meat

Michael D. Eggen and Marcus A. Glomb*

 Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69, 15374–15383

 Read Online

ACCESS |

 Metrics & More

 Article Recommendations

 Supporting Information

ABSTRACT: The reaction of the N^{ϵ} -amino group of lysine residues and 1,2-dicarbonyl compounds during Maillard processes leads to advanced glycation end products (AGEs). In the present work, we deliver a comprehensive analysis of changes of carbohydrates, dicarbonyl structures, and 11 AGEs during the grilling of porcine meat patties. While raw meat contained mainly glyoxal-derived N^{ϵ} -carboxymethyl lysine (CML), grilling led to an increase of predominantly methylglyoxal-derived AGEs N^{ϵ} -carboxyethyl lysine (CEL), N^{ϵ} -lactoyl lysine, methylglyoxal lysine dimer (MOLD), and methylglyoxal lysine amide (MOLA). Additionally, we identified and quantitated a novel methylglyoxal-derived amidine compound N^1,N^2 -di-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-lactoylamidine (methylglyoxal lysine amide, MGLA) in heated meat. Analysis of carbohydrates suggested that approximately 50% of the methylglyoxal stemmed from the fragmentation of triosephosphates during the heat treatment. Surprisingly, N^{ϵ} -lactoyl lysine was the major AGE, and based on model incubations, we propose that approximately 90% must be explained by the nonenzymatic acylation of lysine through *S*-lactoylglutathione, which was quantitated for the first time in meat herein.

KEYWORDS: Maillard reaction, meat, amidine, *S*-lactoylglutathione, advanced glycation end products

INTRODUCTION

During the processing of foods, the amine-catalyzed breakdown of carbohydrates leads to changes of color as well as taste. This reaction cascade was first investigated by Louis Camille Maillard, and from today's perspective, 1,2-dicarbonyl structures, which are formed via various nonenzymatic and enzymatic pathways including sugar fragmentations and fat oxidation, were established as the central intermediates of the Maillard reaction.^{1,2}

Additionally, Maillard reactions lead to a variety of stable and structurally heterogeneous protein adducts, which are summarized under the term advanced glycation end products (AGEs). From a mechanistic point of view, the central formation pathway of these protein modifications includes the reaction of nucleophilic side chains, e.g., lysine residues, with short-chained 1,2-dicarbonyl compounds, which subsequently stabilize to AGEs via isomerization among others.^{3,4} As the best understood example, reactions of glyoxal and lysine lead to N^{ϵ} -carboxymethyl lysine (CML), imidazolium cross-link glyoxal lysine dimer (GOLD), as well as the amide structures N^{ϵ} -glycolyl lysine (GALA) and glyoxal lysine amide (GOLA).³ Very recently, the formation of the amidine structure glyoxal lysine amidine (GLA) was ascribed to this so-called CML-isomerization cascade (Figure 1).⁵ These reaction products as well as the structurally analogous compounds derived from the methylglyoxal lysine reaction cascade, N^{ϵ} -carboxyethyl lysine (CEL), methylglyoxal lysine dimer (MOLD), N^{ϵ} -lactoyl lysine, and methylglyoxal lysine amide (MOLA), were already quantitated in a variety of model incubations but also in food proteins and *in vivo*.^{6–9} However, apart from isomerization mechanisms, an alternative oxidative formation pathway of Amadori products leads also to CML and GOLA,

whereas N^{ϵ} -lactoyl lysine is formed also by β -dicarbonyl fragmentation of 1-deoxy-3,5-hexodiulose and by a nonenzymatic acyl transfer through *S*-lactoylglutathione, which was confirmed very recently in model incubations.^{3,10,11} Additionally, lactate was introduced as a precursor for lysine lactoylation in cell cultures, while the enzymatic acylation of lysine via lactoyl-CoA is a subject of ongoing discussions.¹²

From a nutritious point of view, AGEs in diets are discussed in the literature to be detrimental by blocking essential lysine residues, hampering proteolysis, and adding to inflammatory events. On the other hand, the intestinal absorption and also metabolism of selected AGE structures through human gut flora during digestion were reported.^{13–16} Thus, the quantitation of AGEs in different foods, especially of highly processed products such as baking products, is a hot working field in regard to estimating the daily load of dietary AGEs. However, when it comes to quantitation of AGEs in meat, the literature heavily focuses on CML and CEL, but other products within the isomerization cascades of lysine with glyoxal and methylglyoxal are virtually unknown in meat products.¹⁷ Thus, the aim of the present work was to give a comprehensive overview of glyoxal- and methylglyoxal-derived AGEs and, additionally, of changes of different precursor metabolites in porcine meat including 1,2-dicarbonyls to gain mechanistic insights into AGE formation during grilling.

Received: October 28, 2021
Revised: December 2, 2021
Accepted: December 3, 2021
Published: December 14, 2021



 ACS Publications

© 2021 The Authors. Published by
American Chemical Society

15374

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06835>
J. Agric. Food Chem. 2021, 69, 15374–15383

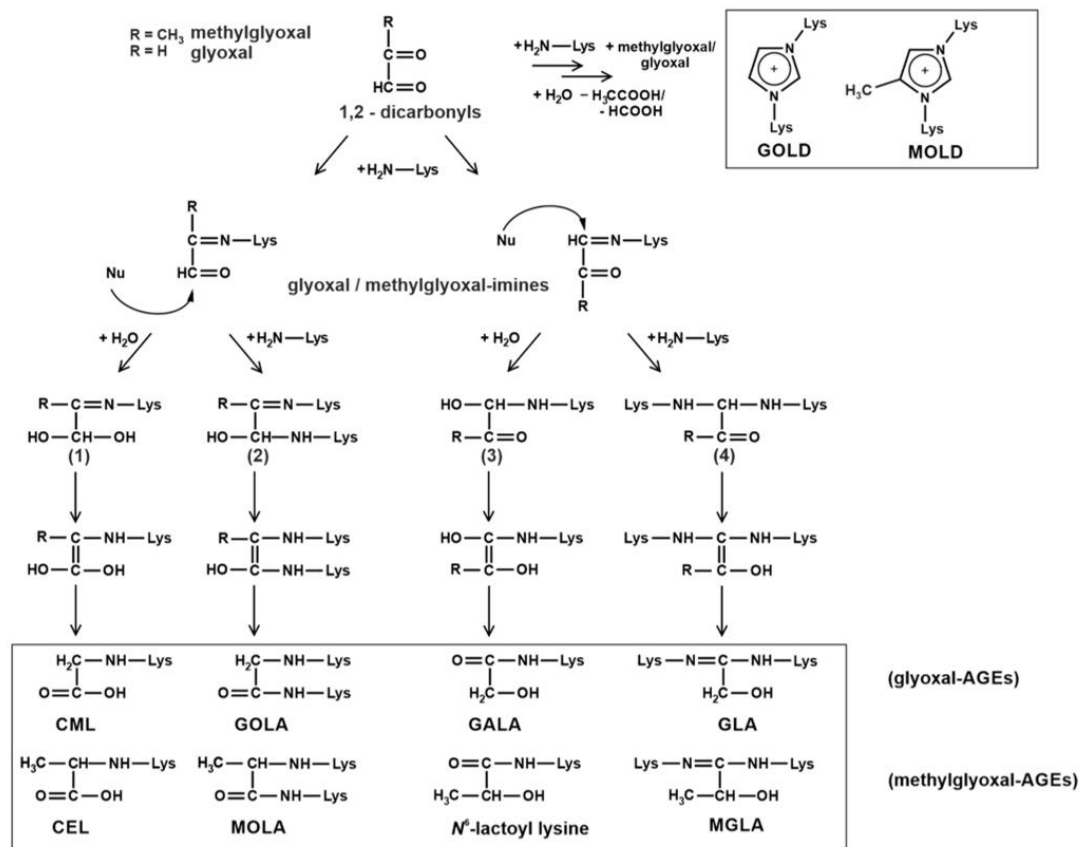


Figure 1. Formation of AGEs from the reaction of methylglyoxal and glyoxal with lysine.

Furthermore, we were able to synthesize and fully characterize a novel methylglyoxal-derived amidine cross-link structure, methylglyoxal lysine amidine (MGLA), which was unequivocally identified in processed meat by spectrometric collision-induced fragmentation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest purity available were obtained by Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), Acros Organics (Geel, Belgium), Iris-Biotech (Marktredwitz, Germany), Armar Chemicals (Leipzig, Doettingen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Alfa Aesar (Ward Hill), and TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium) unless otherwise indicated. Authentic reference material N⁶-carboxymethyl lysine (CML),¹⁸ N⁶-carboxyethyl lysine (CEL), N⁶-glycolyl lysine (GALA),³ glyoxal lysine amidine (GLA),⁵ glyoxal lysine dimer (GOLD),³ glyoxal-derived imidazole cross-link GODIC, glyoxal lysine amide (GOLA),³ N⁶-lactoyl lysine,¹⁰ methylglyoxal lysine amide (MOLA),⁸ methylglyoxal lysine dimer (MOLA),¹⁹ N²-*t*-Boc-lysine *t*-butyl ester (1),⁸ methylglyoxal-derived imidazole cross-link (MODIC),²⁰ (tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]lactic acid (2),³ and N²-*t*-Boc-[(N⁶-tetrahydropyran-2-yl)lactoyl]lysine (3)¹⁰ were synthesized or isolated from incubation mixtures according to the literature.

Synthesis of N⁶,N²-Di-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-lactoylamidine (MGLA). MGLA was synthesized according to amidine cross-link GLA, which was recently published by our working group.⁵ Briefly,

772.2 mg (1.68 mmol) of (3) was dissolved in 24 mL of dry dichloromethane and cooled to 0 °C. Then, 255.6 mg (1.32 mmol, 0.78 equiv) of triethylxonium tetrafluoroborate in 6 mL of dry dichloromethane was added dropwise under stirring under an argon atmosphere. The reaction mixture was allowed to slowly warm up to room temperature and stirred overnight. Then, 712.8 mg (2.34 mmol, 1.4 equiv) of (1) in 6 mL of dry dichloromethane was added. After 24 h, volatiles were evaporated at 40 °C, the residue was basified with 6 mL of 2.5 N sodium hydroxide solution, and the amidine compound was extracted with 3 × 12 mL ethyl acetate and dried over sodium sulfate before solvents were evaporated. The residue was hydrolyzed in acetone/6 M hydrochloric acid (1:1, v/v) for 1 h at room temperature. Solvents were removed in vacuum, and the crude mixture was purified by column chromatography (Lichoprep RP C18, water/methanol 74:16 (v/v) + 1.2 mL HFBA). Material with R_f 0.25 (silica gel 60, *n*-butanol/acetic acid/pyridine/water, 4:3:3:2, staining with ninhydrine) was combined and subjected to preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) (VYDAC 218TP1022, 250 × 20 mm, RP18, 10 μm, isocratic water/methanol 74:16 + 1.2 mL HFBA). Fractions containing MGLA (*t*_R 26–38 min) were combined and instantly concentrated under reduced pressure at 40 °C. The residue was lyophilized several times to yield (5) as a colorless foam (45 mg, 0.045 mmol, 2.7%).

Preparation of Meat Samples. Minced porcine meat samples (4 × 500 g) were purchased at a local supermarket and pooled. Patties containing 128 g of meat were formed and grilled for 3, 5, and 8 min using an electric indoor grill (Tefal GC3050, Group SEB, Frankfurt,

Table 1. Mass Spectrometric Parameters for the Quantitation of AGEs and Metabolites in Meat

AGE	retention time (min)	precursor ion		product ion 1 ^a			product ion 2 ^b			product ion 3 ^b		
		m/z (amu)	DP ^c (V)	m/z (amu)	CE ^d (eV)	CXP ^e (V)	m/z (amu)	CE (eV)	CXP (V)	m/z (amu)	CE (eV)	CXP (V)
CML	11.7	205.2	42	84.1	30.0	14.0	130.0	17.0	9.0	56.1	59.0	9.0
GALA	12.2	205.2	40	142.1	20.0	11.0	84.1	36.0	14.0	159.1	15.0	10.0
N ^ε -lactoyl lysine	16.1	219.2	40	156.2	20.0	8.0	84.1	35.0	9.0	173.1	17.0	8.0
CEL	17.2	219.2	54	84.1	33.0	7.0	130.1	18.0	11.0	56.1	59.0	8.0
GOLD	28.0	327.2	60	84.1	51.0	13.0	282.3	31.0	14.0	198.1	28.0	14.0
GLA	28.3	333.2	85	157.1	29.0	10.0	84.1	45.0	14.0	130.0	35.0	6.5
GOLA	28.8	333.2	45	169.1	26.0	12.0	84.1	54.0	13.0	130.0	32.0	9.0
MOLD	29.1	341.3	45	296.3	33.0	18.0	84.1	52.0	14.0	212.3	31.0	17.0
MGLA	29.3	347.2	85	157.1	29.0	12.0	84.1	52.0	10.0	130.0	35.0	10.0
MOLA	29.7	347.2	85	173.2	31.0	12.0	84.1	57.5	7.0	130.0	37.0	12.0
GODIC	30.3	343.3	20	298.4	32.0	8.0	183.2	44.0	13.0	70.2	74.0	11.0
MODIC	31.2	357.3	25	312.2	35.0	7.0	267.3	45.0	15.0	197.4	45.0	14.0
metabolite												
G3P ^f	27.4	298.1	45	156.2	30.0	15.0	182.1	25.0	15.0	200.1	20.0	15.0
DHAP ^f	26.5	298.1	45	200.1	17.5	15.0	182.1	30.0	15.0	167.2	45.0	15.0
S-D-lactoylglutathione	18.7	380.4	70	233.2	20.0	12.0	76.0	55.0	10.0	251.3	15.0	17.0
glyoxal ^g	15.3	131.1	32	77.0	40.0	6.0	104.0	30.0	8.0			
methylglyoxal ^g	16.4	145.0	50	77.0	41.0	5.0	118.1	30.5	7.0	65.0	45.0	5.0

^aMRM transition used for quantification. ^bMRM transition used for confirmation. ^cDelustering potential. ^dCollision energy (CE). ^eCell exit potential (CXP). ^fNaphthylamine derivative. ^gQuinoxaline derivative.

Germany). The griddles had a temperature of 200 °C and were directly in contact with both sides of the patties. Each treatment was done with four separate samples. The surface temperatures were measured using an infrared thermometer (TFA Dostmann, Wertheim, Germany), and internal temperatures were monitored using a contact thermometer (Westmark, Lennestadt-Elspe, Germany). Afterward, the samples were homogenized using a Moulinette (Moulinex, France) and subsequently lyophilized. Then, fat was removed by repetitive addition of petroleum ether and shaking for 5 min, followed by ultrasonic extraction for an additional 5 min and centrifugation (4000g, 20 min). In total, the procedure was repeated four times, afterward the samples were dried and stored at −18 °C.

Combined Extraction of Proteins and Carbohydrates. Defatted and lyophilized meat sample (500 mg) was weighed in a 15 mL centrifuge tube and homogenized in 5.5 mL of water/methanol (81:19, v/v) using an Ultra-Turrax (Ika, Germany). Proteins were precipitated by the addition of 1 mL of 50% (w/w) trichloroacetic acid (TCA). Afterward, protein pellets were collected by centrifugation (8000g, 10 min, 4 °C) and the supernatant was used for carbohydrates analysis. The crude protein pellets were washed several times with cold acetone and dried. Then, 9 mg of the resulting protein powder was weighed in a 2 mL tube and homogenized in 1.5 mL of phosphate-buffered saline (PBS, 20 mM phosphate, 150 mM sodium chloride) using a mixer mill (Retsch MM400, Germany) combined with zirconium oxide grinding balls (5 mm) at 30 Hz for 45 min. Aliquots of the suspension were used for acidic and enzymatic hydrolysis.

For carbohydrate analysis, 550 μL of supernatant was filtered through a 0.45 μm cellulose acetate Costar Spin-X filter (Corning, Inc., Corning, NY). The filtrate (150 μL) was placed in a 1.5 mL tube, and the pH was adjusted by the addition of 50 μL of 4M acetate buffer (pH 5.5). The samples were immediately derivatized by the addition of 100 μL of sodium cyanoborohydride [1 M in dimethyl sulfoxide (DMSO)] and 100 μL of 1-naphthylamine (0.2 M, DMSO/15% acetic acid, 1:1, v/v) for 16 h at room temperature according to the literature.⁶ Samples were stored at −18 °C until HPLC analysis.

Acid Hydrolysis. Aliquots of protein sample (200 μL) were placed in a screw-cap vial, and 200 μL of PBS and 100 μL of sodium borohydride (NaBH₄) solution (15 mg/mL in 0.01 M NaOH) were added. After incubation for 1 h at room temperature, solvents were

evaporated in a vacuum concentrator (Savant-Speed-Vac Plus SC110 A combined with a Vapor Trap RVT 400, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Hydrochloric acid (800 μL, 6 N) was added, and the samples were hydrolyzed at 110 °C for 20 h under an argon atmosphere. The acidic solvent was removed using a vacuum concentrator, and the residue was resuspended in 0.05 mM hydrochloric acid. After filtration through a 0.45 μm Spin-X filter, the samples were subjected to high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Analysis of amidine structures GLA and MGLA was done as described above, but reduction with NaBH₄ was omitted.

Enzymatic Hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was done as previously described by Baldensperger et al.²¹ Briefly, aliquots of protein samples (250 μL) were diluted with 250 μL of PBS and digested with a mixture of enzymes containing pronase E (0.3 U, two additions), leucine aminopeptidase (1.0 U), and carboxypeptidase Y (0.95 U). Enzymes were added stepwise and incubated for 24 h each in a shaker incubator at 37 °C. To prevent microbiological growth during incubation, a small crystal of thymol was added with the first addition of enzyme. After completion of the digestion procedure, the reaction mixture was filtered through a 3000 Da molecular weight cutoff filter (VWR International, Radnor, PA). Filtrates were appropriately diluted with highly purified water before injection into the HPLC-MS/MS system.

Analysis of 1,2-Dicarbonyl Compounds. In general, homogenization was done as described above, but 1.880 mL of 2 M format buffer pH 3.0 and 2.022 mL of 10 mM *o*-phenylenediamine were added immediately after homogenization and derivatization was done under an argon atmosphere in the dark. After 16 h, 1880 μL of 2 M trifluoroacetic acid was added and incubated for 1 h on ice, then the precipitated proteins were separated by centrifugation (12 000g, 20 min). The supernatant was neutralized with 550 μL of 4M ammonium hydroxide and an aliquot of 550 μL was filtered through a 0.45 μm Spin-X filter. Appropriately diluted samples were subjected to HPLC-MS/MS.

Analysis of S-D-Lactoylglutathione. Raw meat sample (5 g) was homogenized for 1 min on ice in 11 mL of water/methanol (81:19, v/v) using an Ultra-Turrax. After centrifugation (12 000g, 20 min, 4 °C), the aqueous extract was carefully removed and filtered through a filter paper (Schleicher and Schuell, 595 1/2) prior to filtration by a

3000 Da molecular weight cutoff filter (VWR International, Radnor, PA). Filtrates were immediately subjected to HPLC-MS/MS.

Analytical HPLC-MS/MS. The HPLC system (Jasco, Groß-Umstadt, Germany) consisted of a pump (PU-2080), a degasser (LG-2080-02), a quaternary gradient pump (LG-2080-04), a column oven (Jasco Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on an API 4000 QTrap LC-MS/MS system (AB Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion spray source using electrospray ionization (ESI) in positive mode: sprayer capillary voltage of 2.5 kV, nebulizing gas flow of 70 mL/min, heating gas of 80 mL/min at 650 °C, and curtain gas of 40 mL/min. The optimized mass spectrometric parameters of the analytes are summarized in Table 1. Quantitation was based on the standard addition method. More specifically, increasing concentrations of authentic reference standards at factors 0.5, 1, and 2 times of the concentration of the analyte in the sample were added to aliquots of the sample. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated at signal-to-noise ratios of 3 and 9, respectively (Table 2).

Table 2. LOD and LOQ of AGEs and Metabolites in Meat

AGE	AGEs		
	LOD ($\mu\text{mol}/\text{kg protein}$)	LOQ ($\mu\text{mol}/\text{kg protein}$)	
CML	0.26	0.77	
GALA	0.22	0.65	
N ^ε -lactoyl lysine	0.19	0.56	
CEL	0.27	0.80	
GOLD	0.57	1.72	
GLA	0.69	2.06	
GOLA	3.58	10.74	
MOLD	1.11	3.34	
MGLA	0.75	2.24	
MOLA	1.75	5.26	
GODIC	0.71	2.12	
MODIC	0.39	1.16	
metabolites			
metabolite	LOD (nmol/g ^d)	LOQ (nmol/g ^d)	recovery rates (%)
glucose ^a	58	174	96 ± 5
glucose-6-phosphate ^a	401	1205	75 ± 5
ribose ^a	59	177	94 ± 1
G3P ^b	0.34	1.01	23 ± 4
DHAP ^b	0.31	0.94	47 ± 3
S-D-lactoylglutathione	0.32	0.96	42 ± 2
glyoxal ^c	0.11	0.34	70 ± 4
methylglyoxal ^c	0.24	0.71	75 ± 6

^aNaphthylamine derivative, fluorescent detection. ^bNaphthylamine derivative, mass spectrometric detection. ^cQuinoxaline derivative, mass spectrometric detection. ^dFat-free dry matter.

Advanced Glycation End Products and S-Lactoylglutathione. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Xselect, HSS T3, 250 mm × 3.0 mm, RP18, 5 μm , Waters, Massachusetts) using a flow rate of 0.7 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 2% B (2 min) to 14% B (10 min) to 87% B (34 min) to 100% B (34.5–41.5 min) to 2% B (44–55 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid was added.

1,2-Dicarbonyl Compounds. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Eurosphere-100, 250 mm × 30 mm, RP18, 5 μm , Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 5% B (0.1 min) to 35% B (0.6 min) to 47% B (12.6 min) to 100% B (17–25 min) to 5% B (30–45 min). Eluents were water (solvent A) and a

mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added.

Triosephosphates. Chromatographic separations were performed on a stainless steel column (Eurosphere-100, 250 mm × 30 mm, RP18, 5 μm , Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 20% B to 45% B (35 min) to 100% B (50–60 min) to 20% B (65–75 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added.

Analytical HPLC-FLD. The chromatographic setup was identical to the analysis of triosephosphates as described above, and the fluorometric detector excitation and emission wavelengths were set to 318 and 440 nm, respectively.

Enrichment of Analytes and Collision-Induced Dissociation (CID). MGLA. Acidic protein hydrolysates up to 30 μL were repetitively injected into an analytical Jasco HPLC system, which consisted of a pump (PU-2080 Plus), a degasser (DG-2080-54), a quaternary gradient pump (LG-2080-04), a fluorescent detector (FP-2020 Plus), a column oven (Jasco Jetstream II), and an autosampler (AS-2055 Plus). Chromatographic separation was performed on a stainless steel column (VYDAC 218TP54, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 μm , Hesperia, CA) using a flow rate of 1.0 mL/L and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 2% B (5 min) to 63.6% B (26 min) to 100% B (30–35 min) to 2% B (40–45 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B), 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid was added. Fractions from the column containing MGLA were collected using a CHF122SB fraction collector (Advantec MFS, Dublin), concentrated in vacuum, and subsequently lyophilized. After resuspension in highly purified water, the target fraction was injected into HPLC-MS/MS as described above. Collision-induced dissociation (CID) setup was as followed: declustering potential was 85 V, the further parameters collision energy (CE) and cell exit potential (CXP) were changed with different m/z values to get the optimal ion yields for individual MGLA fragments (m/z (CE/CXP); 50–149 (42 eV/7 V); 150–299 (30 eV/10 V); 300–350 (25 eV/10 V)).

S-D-Lactoylglutathione. Aqueous extract of raw meat, up to 30 μL , was injected into the identical HPLC system described above. Chromatographic separation was performed on a stainless steel column (Eurosphere-100, 250 mm × 30 mm, RP18, 5 μm , Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/L and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 5% B (5 min) to 46% B (20 min) to 100% B (26–31 min) to 5% B (35–40 min), and fractions were collected as described above. Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B), both containing 0.6 mL/L HFBA. For CID spectra, DP and CXP were attuned to 70 V and 12 V, respectively, and CE was changed with different m/z values. (m/z (CE); 50–99 (50 eV); 100–199 (35 eV); 200–319 (20 eV); 320–381 (12 eV)).

Incubation of Methylglyoxal and S-D-Lactoylglutathione with N^ε-t-Boc-Lysine. N^ε-t-Boc-lysine (40 mM) and methylglyoxal or S-D-lactoylglutathione (8 mM) were incubated in 0.1 M phosphate pH 7.4 under aeration in a water bath at 50 °C. In the second experiment, concentrations of methylglyoxal and S-D-lactoylglutathione were adjusted to 1.45 mM and S-D-lactoylglutathione to 0.065 or 0.118 mM in 0.1 M phosphate pH 6.0. Aliquots were taken after 5 h and 7 h and frozen instantly at −18 °C. Before analysis, the samples were dissolved in 3 M hydrochloric acid and kept for 30 min at room temperature. The acid solvent was removed in a vacuum concentrator (Savant-Speed-Vac Plus SC110 A combined with a Vapor Trap RVT 400, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), and the residue was resuspended and filtered through a 0.45 μm Spin-X filter. The samples were appropriately diluted before injection into HPLC-MS/MS.

High-Resolution Mass Determination (HR-MS). Positive-ion high-resolution electrospray ionization (ESI) mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a heated ESI electrospray ion

source (spray voltage 3.5 kV, capillary temperature 275 °C, source heater temperature 40 °C, FTMS resolution > 30,000). Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μ L Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 μ L/min. The instrument was externally calibrated by Pierce LTQ Velos ESI positive-ion calibration solution (product number 88323, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL 61105). The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. NMR spectra were recorded on a VXR 400 spectrometer (Varian, Palo Alto) operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C . SiMe_4 was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Raw meat samples were always worked up and analyzed in triplicate.

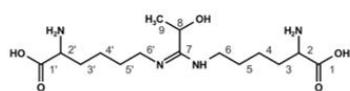
Grilled meat products were prepared fourfold, and separate patties were worked up and analyzed in duplicate. In general, recovery rates were determined by the addition of authentic reference standards prior to the homogenization step with three independent treatments.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Characterization of N^1,N^2 -Di-(5-amino-5-carboxypentyl)-2-hydroxy-propylamidine (MGLA). MGLA was prepared as previously described for amidine cross-link GLA by our working group using a five-step synthesis, with the only exception of using lactic acid instead of glycolic acid (Figure SI-1).⁵ The structural elucidation of MGLA was achieved using ^1H - and ^{13}C NMR and two-dimensional (2D)-NMR homonuclear correlation spectroscopy (H,H-COSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques. Additionally, the elemental composition was confirmed using high-resolution mass spectrometry (Table 3). In general, NMR signals were in line with resonances of GLA, which were previously characterized.⁵ The only structural difference between GLA and MGLA is the additional methyl group at carbon 8 and, thus, proton 8 gave a quartet at 4.81 ppm, whereas the protons of the methyl group 9 showed a

Table 3. High-Resolution Mass and ^1H - and ^{13}C NMR Spectroscopic Data of MGLA (in D_2O)

C/H	HR-MS $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z)	347.2290
	calcd $\text{C}_{13}\text{H}_{31}\text{O}_3\text{N}_4^+$ (m/z)	347.2295
	δ ^1H [ppm]	δ ^{13}C [ppm]
1, 1'		171.9
2, 2'	3.89 (t, 2H) $^3J = 6.3$ Hz	52.6
3, 3'	1.86 (m, 4H)	29.3
4, 4'	1.36 (m, 4H)	21.5, 21.4
5, 5'	1.60 (m, 4H)	28.5, 26.3
6	3.23 (t, 2H) $^3J = 7.0$ Hz	40.7
6'	3.31 (t, 2H) $^3J = 7.5$ Hz	42.5
7		168.1
8	4.81 (q, 1H) $^3J = 6.7$ Hz	62.8
9	1.35 (d, 3H) $^3J = 6.7$ Hz	20.0



duplet at 1.35 ppm (Figure SI-2). As expected, MGLA standard gave a nearly identical fragmentation pattern compared to amidine structure GLA in collision-induced dissociation experiments (Figure 3). For the latter, fragments were extensively characterized using high-resolution mass spectrometry.⁵

Experimental Setup. For the experimental setup, minced porcine meat from a local supermarket was chosen. Nutritional values of raw meat were analyzed according to national reference methods §64 LFGB: (g/100 g): moisture 66.2 ± 0.7 g/100 g; ash 0.90 ± 0.02 g/100 g; protein 18 ± 2 g/100 g; fat 15 ± 2 g/100 g; hydroxyproline 0.17 ± 0.02 g/100 g; pH value 6.0. Meat samples of about 128 g (± 2 g) and 1 cm thickness were formed and in each case, four separate patties were heated for 3, 5, and 8 min. The internal temperature of 95 °C was reached after approximately 5 min and remained stable (Figure SI-3). To cope with roasting weight losses (Figure SI-3), values of metabolites were referred to the fat-free dry matter and, consequently, the values of AGEs referred to the whole meat (Figure 2) were standardized to the protein content of raw meat.

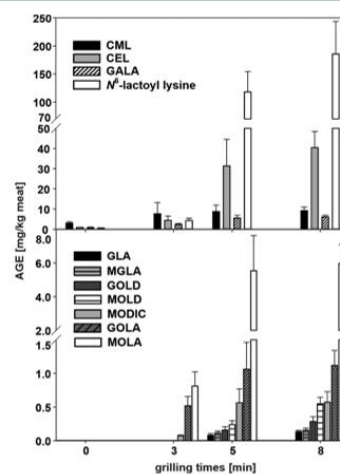


Figure 2. Time-dependent formation of AGEs in meat samples during grilling (200 °C). (A) Monovalent structures and (B) cross-link AGEs.

Determination of Advanced Glycation End Products in Meat. In the present work, we give a comprehensive overview of 11 glyoxal- and methylglyoxal-derived AGEs, and besides CML and CEL, all other AGEs compounds were identified and quantitated for the first time in meat using high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Therefore, meat proteins were isolated using trichloroacetic acid and subsequently reduced using sodium borohydride and acid-hydrolyzed. However, in respect of the lability of amide structures and amidine structures toward acid and sodium borohydride, respectively, each sample was additionally hydrolyzed both enzymatically and also acidic without reduction.⁵ The hydrolysis efficiency of the four-step enzymatic hydrolysis was calculated based on the acid-stable CEL and was about 60%, which ranges comparable to previous reports of highly modified grillings incubated with glyoxal.⁵ By

definition, the CEL content of the acid hydrolysis was set to 100%. On the other hand, in this approach, the whole protein fraction of meat was subjected to hydrolysis, including poorly soluble protein fractions, as collagen. The purity of the isolated protein fractions was calculated based on the nitrogen content, which was determined by the Kjeldahl method. The overall results are shown in Figure 2. In raw meat, glyoxal-derived CML was the leading AGE structure with amounts of 3.0 mg/kg, and grilling led to an increase by a factor of three to 9.2 mg/kg, which is in line with the ranges of 0.6–2.5 and 6–22 mg/kg given in the literature for raw and processed porcine meat, respectively.^{17,22–25} It is worth noting that CML is formed via additional pathways including the oxidative fragmentation of Amadori products. However, the initial levels of glyoxal specific AGEs GOLA, GOLD, and the novel glyoxal-derived amidine structures GLA gave a comparable increase of about a factor of 2 during the heat treatments, which indicates that glyoxal is also the major precursor for CML in meat. The only exception herein was GALA increasing by a factor of about 10. In contrast, carboxyethyl lysine (CEL) gave values of about 0.9 mg/kg in raw meat and increased by a factor of about 40 at 8 min grilling times to 40.0 mg/kg. Again, results were comparable with the broad ranges in previous reports between 1.8 and 2.3 mg/kg for raw meat and 2.8 and 33 mg/kg for processed meat.^{17,23,24} Interestingly, the CML-to-CEL ratio changed during grilling from about 3:1 to 1:5, which is in line with the doubled to 4-fold levels of methylglyoxal-derived imidazolium structure MOLD and amide structure MOLA, compared to the glyoxal analogous GOLD and GOLA. Additionally, lysine-arginine-derived cross-link MODIC was quantitated with about 0.4 mg/kg, whereas GODIC was below LOD. These results are all in line to confirm methylglyoxal as the leading precursor for AGEs in meat. However, contradictory results are given for relative concentrations of protein-bound CML and CEL. While some authors reported factors of 2–3 more CML compared to CEL in processed meat,^{24,26,27} others declare nearly the opposite.^{17,23} The differences may be ascribed to the type and thickness of the meat sample and overall processing conditions including temperature and time. For instance, Yu et al. reported that sterilization (121 °C, 30 min) gave a CML-to-CEL ratio of about 1:2, which was nearly reversed after pasteurization (85 °C/4 h), but clear mechanistic background information, e.g., including the measurements of 1,2-dicarbonyls and carbohydrates, was missing.²³ Surprisingly, in the present report, the most important AGE in meat was *N*⁶-lactoyl lysine with values of about 186 mg/kg, which exceeded CEL by a factor of about 5. As a rule, model incubations on the CEL-isomerization cascade of methylglyoxal and *N*²-*t*-Boc-lysine, lead to about 10 times more CEL compared to *N*⁶-lactoyl lysine, which was also in full support with the ratio of CEL (2.1–8.1 mg/kg) to *N*⁶-lactoyl lysine (0.15–0.72 mg/kg) reported for bread wheat rolls.⁶ Obviously, the present high concentration of *N*⁶-lactoyl lysine must be driven by an additional unknown mechanistic pathway in meat, which will be discussed below.

Very recently, a novel amidine compound, namely, GLA was identified in bakery products.⁵ Here, we identified GLA in meat and additionally the novel methylglyoxal-derived amidine structure MGLA, which was unequivocally established in grilled meat after enrichment by comparison of retention time and collision-induced fragmentation pattern with the synthesized authentic reference. As shown in Figure 3, the CID spectra from the meat extract were virtually identical to the

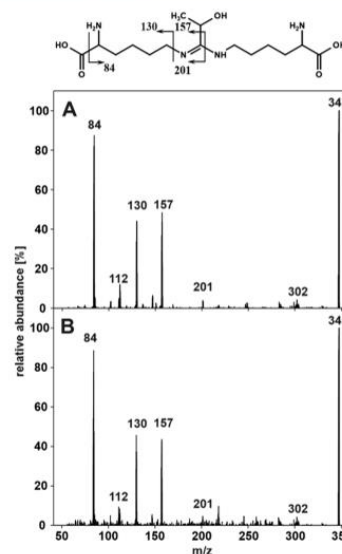


Figure 3. Verification of MGLA by collision-induced dissociation (CID) of m/z 347 ($M + H$)⁺. (A) Authentic reference standard and (B) enriched acid hydrolysate of meat samples.

authentic reference standard. Based on a quantitative manner, both amidine structures GLA and MGLA were about 2 and 4 times less concentrated than the corresponding imidazolium cross-link compounds GOLD and MOLD, which was also true for model incubations of *N*²-*t*-Boc-lysine with glyoxal.⁵ However, based on their intrinsic strong basicity, future research will be needed to clarify the impact of the novel amidine-AGE class on protein conformation and nutritional aspects.

Analysis of Dicarbonyls and Carbohydrates. Glyoxal and methylglyoxal were determined as their respective quinoxalines after derivatization with *o*-phenylenediamine according to the literature with minor modification.²⁸ To prevent any artificial formation of methylglyoxal from the fragmentation of triosephosphates glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP) during the sample workup, derivatization was done in acidic formate buffer.²⁸ As shown in Figure 4, glyoxal was about a factor of 4 higher compared to methylglyoxal in raw meat and decreased by 33% during grilling, consistent with reactions to form glyoxal-

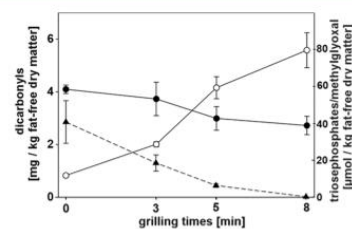


Figure 4. Changes of glyoxal (solid circles) and methylglyoxal (open up circles) and sum of glyceraldehyde-3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate (solid triangles) during grilling (200 °C).

derived AGEs. Contradictorily, methylglyoxal was starting at values of about 0.7 mg/kg in raw meat and grilling led to a strong increase to give 5.6 mg/kg after 8 min, which was nearly double that of glyoxal and comparable to results for pan-fried hamburgers in the literature.²⁹ The measurement of 1,2-dicarbonyl structures gave further insights into the chemical background of AGE formation within the processing. While the large increase of free methylglyoxal is in line with the rise of methylglyoxal AGEs, glyoxal did not exceed the starting levels and explains the lower yields of glyoxal AGEs. Basically, both glyoxal and methylglyoxal are derived from the Maillard-catalyzed fragmentation of carbohydrates; thus, we used an established analytical approach including reductive amination with 1-naphthylamine to quantify the main carbohydrates as possible precursors for 1,2-dicarbonyls in meat.³⁰ According to literature, porcine meat contains mainly glucose and lower amounts of glucose-6-phosphate and ribose.^{31–33} As shown in Table 4, grilling decreased all of these sugars by a factor of

Table 4. Degradation of Carbohydrates in Meat Samples during Grilling (200 °C)

grilling times (min)	glucose	glucose-6-phosphate	ribose
	[mmol/kg fat-free dry matter]		
raw	24.5 ± 0.5	6.3 ± 0.5	1.6 ± 0.5
3	20.4 ± 1.2	5.0 ± 0.6	1.4 ± 0.1
5	13.4 ± 1.1	3.3 ± 0.4	0.7 ± 0.1
8	8.4 ± 1.2	2.2 ± 0.6	0.6 ± 0.1

about 3, which contributes to Maillard reactions including fragmentations to lead to the corresponding 1,2-dicarbonyl structures, but this did not explain the difference between glyoxal and methylglyoxal formation. Thus, we analyzed G3P and DHAP, which were easily degraded in aqueous model incubations to methylglyoxal and are widely accepted as the most important precursors for methylglyoxal in physiological systems.^{28,34,35} However, in the case of triosephosphate analysis, the use of acidic conditions as it is a prerequisite for methylglyoxal analysis is not ideally for subsequent derivatization reactions. Thus, losses of triosephosphate structures during samples workup were expected and, consequently, to cope with losses, the recovery rates of both triosephosphates and methylglyoxal considered in Figure 4. Indeed, raw meat contained about 40 μ mol/kg fat-free dry matter triosephosphates, which is in comparable range to previous reports.^{36,37} Grilling led to a complete degradation, which explains about 50% of the formed free methylglyoxal at the final stages assuming complete conversion. Glyoxal and methylglyoxal can also form from lipid oxidation, e.g., at a temperature of 200 °C, butter and margarine were reported to give about 3 times higher yields of methylglyoxal compared to glyoxal, but a clear mechanistic background was not given.^{2,38} Thus, under the harsh processing conditions as herein, fat oxidation may also contribute to 1,2-dicarbonyls in meat and further research is needed to clarify the relevance compared to Maillard sugar degradation pathways.

Formation of *N*⁶-Lactoyl Lysine through Nonenzymatic Acylation. Besides the formation of *N*⁶-lactoyl lysine within Maillard reactions, novel pathways were recently proposed under physiological conditions. Zhang et al. confirmed lactate as a substrate for *N*⁶-lactoyl lysine in cell culture via ¹³C-label experiments and verified an enzymatically catalyzed acylation via lactoyl-CoA *in vitro*.¹² Activation of

carboxylic acids as the corresponding CoA-thioesters is an important mechanism in physiological systems, and recent research revealed widespread enzymatic and also nonenzymatic lysine acylations through a broad range of acyl-CoA-thioesters.³⁹ However, in the case of lactoyl-CoA, the enzymatic activation mechanism of lactate is poorly understood. Nevertheless, lactoyl-CoA was quantitated in low amounts of about 0.0172 pmol/g in mouse heart, which was magnitudes lower compared to other CoA derivatives like acetyl-CoA.⁴⁰ In contrast, Gaffney et al. reported the nonenzymatic acylation of histone proteins H4 by *S*-lactoylglutathione to give *N*⁶-lactoyl lysine.¹¹ *S*-D-Lactoylglutathione is an intermediate in the enzymatic detoxification pathway of methylglyoxal within the glyoxalase system and was previously quantitated in tissues from normal and diabetic rats in the range of about 3–12 nmol/g.^{41,42}

Neither lactoyl-CoA nor *S*-D-lactoylglutathione was so far described in porcine meat, and we decided to focus on the determination of *S*-D-lactoylglutathione and to develop a suitable HPLC-MS/MS method. However, isolation of *S*-D-lactoylglutathione in meat is challenging because thioester structures are highly reactive to nucleophiles in the meat matrix and to hydrolysis during the aqueous extraction. Thus, to minimize side reactions, the sample workup was done below 4 °C. Nevertheless, we yielded recoveries of about 40% in the meat matrix, which is in comparable ranges as reported in the literature.⁴² As shown in Figure 5, raw meat workup gave

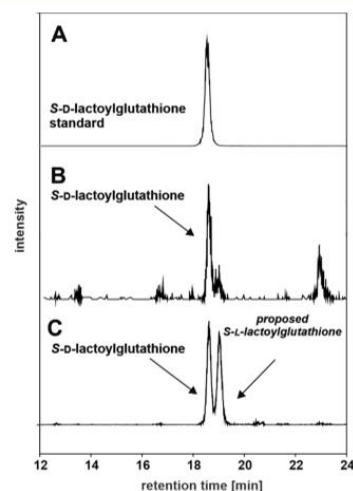


Figure 5. HPLC-MS/MS chromatogram of *S*-lactoylglutathione with ion trace of m/z 380 \rightarrow 233 ($M + H$)⁺. (A) Authentic reference standard, (B) raw meat, and (C) meat grilled for 5 min.

signals with identical retention time and fragmentation pattern compared to the authentic reference standard (Figure 6), which unequivocally clarified the existence of *S*-D-lactoylglutathione in porcine meat. The concentration was determined with 604 ± 94 nmol/kg fat-free dry matter for raw meat, and surprisingly, the amount of *S*-D-lactoylglutathione increased by a factor of 4 during grilling as shown in Figure 7 together with the emergence of a second peak at a slightly different retention time giving virtually the same mass fragmentation pattern (Figure 5).

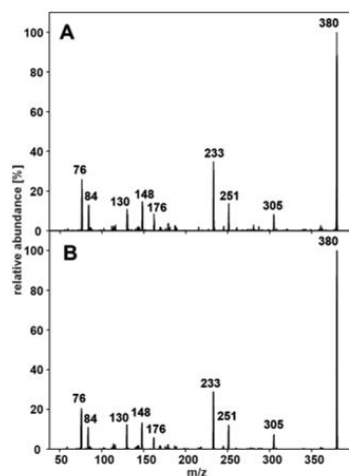


Figure 6. Verification of *S*-lactoylglutathione by collision-induced dissociation (CID) of m/z 380 ($M + H$)⁺. (A) Authentic reference standard and (B) enriched aqueous raw meat extract.

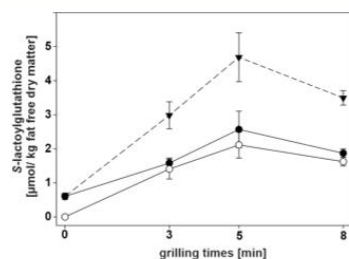


Figure 7. Changes of *S*-*D*-lactoylglutathione (solid circles), proposed *S*-*L*-lactoylglutathione (open up circle), and sum of both isomers (solid triangles) during grilling (200 °C).

While under the harsh processing conditions all proteins must have been denatured, we proposed a nonenzymatic reaction of methylglyoxal and glutathione, which should lead to racemic *S*-lactoylglutathione. There is no commercial standard for *S*-*L*-lactoylglutathione available; thus, we separately verified both isomers from aqueous reaction mixtures of glutathione with *L*-methyl lactate and *D*-methyl lactate, respectively. As expected, incubation of *D*-methyl lactate gave a product with identical fragmentation pattern and retention time as the commercial *S*-*D*-lactoylglutathione standard, while *L*-methyl lactate led to the above second product with slightly different retention times but identical fragmentation pattern (Figure SI-4).

This provides convincing evidence that the novel structure was *S*-*L*-lactoylglutathione. Trials to isolate the structure from meat failed due to the very low concentration and high reactivity, and also first attempts for an independent organic synthesis failed due to the needed complex protection group strategy. Nevertheless, semiquantitative analysis based on the molar response of the *S*-*D*-lactoylglutathione standard revealed a ratio of both diastereoisomers of approximately 1:0.9. Thus, the time-dependent formation pattern in Figure 7 must be explained first by the degradation of enzymatically derived *S*-*D*-

lactoylglutathione present in raw meat within the first minutes, followed by nonenzymatic racemic restoration at a ratio of 1:1 by the reaction of glutathione with methylglyoxal. Indeed, respective aqueous model incubations of both educts verified this notion (Figure SI-5). From a mechanistic point of view, the nonenzymatic formation of *S*-lactoylglutathione can be explained by the formation of a hemithiol-acetal followed by isomerization to yield the thioester compound. Similarly, the formation of *S*-lactoylthioesters in aqueous model systems containing methylglyoxal and *N*²-acetyl cysteine was described previously; however, insights into the stereochemistry were not given.⁴³

Formation of *N*⁶-Lactoyl Lysine in Incubations of *N*²-*t*-Boc-Lysine with Methylglyoxal and *S*-*D*-Lactoylglutathione. It is worth noting that the HPLC-MS/MS method used herein did not distinguish between *N*⁶-*D*-lactoyl lysine and *N*⁶-*L*-lactoyl lysine isomers with respect to retention time and mass spectra. In the first experiments, *N*²-*t*-Boc-Lysine was incubated with equimolar concentrations of methylglyoxal or *S*-*D*-lactoylglutathione, and for the latter, about a factor of 100 more *N*⁶-lactoyl lysine was yielded (Table 5). Other than

Table 5. Formation of *N*⁶-Lactoyl Lysine in Incubations (50 °C) of *N*²-*t*-Boc-Lysine with *S*-Lactoylglutathione (LSGH) and Methylglyoxal (MGO)

incubation of 40 mM <i>N</i> ² - <i>t</i> -Boc-lysine	incubation times (h)	
	5	7
incubation parameters	concentrations [$\mu\text{mol } N^6\text{-lactoyl lysine/mol lysine}$]	
8 mM LSGH, pH 7.4	8000 \pm 1000	9900 \pm 500
8 mM MGO, pH 7.4	93 \pm 5	110 \pm 20
0.065 mM LSGH, pH 6.0	18.4 \pm 2.4	25.4 \pm 4.5
0.118 mM LSGH, pH 6.0	30.4 \pm 2.5	42.5 \pm 3.4
1.45 mM MGO, pH 6.0	2.3 \pm 0.2	3.3 \pm 0.1

efficiency, this can be at least in part explained by the formation of several side products, e.g., CEL, MOLA, and MOLD, through methylglyoxal, while incubation of the latter gave specifically *N*⁶-lactoyl lysine according to the literature.¹¹ Next, to cope with the conditions in processed meat, the pH value was adjusted to 6.0 and concentrations of 1.45 mM methylglyoxal and 0.065 mM *S*-*D*-lactoylglutathione were addressed according to their relative ratio in meat at grilling times of 5 min of about 22:1. For further finetuning, the contribution of the identified *S*-*L*-lactoylglutathione was considered, which increased the concentration of *S*-*D*-lactoylglutathione to 0.118 mM and corresponded to a ratio of methylglyoxal to the sum of both isomers of about 12:1 (Figure 7). In spite of the lower concentrations, the incubation of *S*-*D*-lactoylglutathione gave about factors of 8 and 13 more *N*⁶-lactoyl lysine, respectively. Under the assumption that the overall reactivities in simple model systems are comparable to reactions in meat during grilling, we propose that about 13 mg/kg *N*⁶-lactoyl lysine stems from methylglyoxal, while 172 mg/kg (93%) can be explained by the reaction of both *S*-lactoylglutathione isomers with lysine in the grilled patties.

Thus, in summary, the mismatch between the ratio of CEL and *N*⁶-lactoyl lysine in grilled meat (Figure 2) can be mechanistically ascribed to the newly described nonenzymatic formation of *S*-lactoylglutathione by methylglyoxal and glutathione and the subsequent acylation reaction of lysine

residues. Interestingly, the ratio of CML and GALA in meat samples changed to about 1.4:1, which is in contrast to 13:1 in incubations of bovine serum albumin with glyoxal.⁵ Hence, in analogy, we propose that glutathione catalyzes nonenzymatically the formation of GALA via S-glycolylglutathione. Ongoing research will now clarify the structural evidence for the formation of glutathione derivatives by Maillard reaction intermediates and thereby enhanced protein acylations in foods.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06835>.

Synthesis of MGLA (Figure SI-1); ¹H NMR spectra of MGLA (Figure SI-2); changes of the internal temperature during the grilling of meat and cooking losses (Figure SI-3); synthesis of S-1-lactoylglutathione (Figure SI-4); and HPLC chromatogram and CID spectra of incubations and meat extract (Figure SI-5) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany; orcid.org/0000-0001-8826-0808; Email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: ++049-345-5527341

Author

Michael D. Eggen – Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle/Saale, Germany; orcid.org/0000-0002-9332-7373

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.1c06835>

Funding

Funding was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Germany) Research Training Group 2155-2, ProMoAge.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and Dr. A. Prolov and A. Laub from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS USED

AGE, advanced glycation end products; CID, collision-induced dissociation; CML, N^ε-carboxymethyl lysine; CEL, N^ε-carboxyethyl lysine; DMSO, dimethylsulfoxide; G3P, glycerinaldehyde-3-phosphate; DHAP, dihydroxyacetone-phosphate; GO, glyoxal; GLA, glyoxal lysine amidine; GALA, N^ε-glycolyl lysine; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link; GOLD, glyoxal lysine dimer; GOLA, glyoxal lysine amide; GLA, glyoxal lysine amidine; LSGH, S-lactoylglutathione; MGLA, methylglyoxal lysine amidine; MGO, methylglyoxal; MOLA, methylglyoxal lysine amide; MOLD, methylglyoxal lysine

dimer; MODIC, methylglyoxal-derived imidazoline cross-link; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link

■ REFERENCES

- (1) Hellwig, M.; Henle, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 10316–10329.
- (2) Fu, M.-X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The Advanced Glycation End Product, N^ε-(Carboxymethyl)Lysine, Is a Product of Both Lipid Peroxidation and Glycoxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9982–9986.
- (3) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638–41647.
- (4) Henning, C.; Glomb, M. A. Pathways of the Maillard Reaction under Physiological Conditions. *Glycoconjugate J.* **2016**, *33*, 499–512.
- (5) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Novel Amidine Protein Cross-Links Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 7960–7968.
- (6) Jost, T.; Henning, C.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69*, 3720–3731.
- (7) Smuda, M.; Henning, C.; Raghavan, C. T.; Johar, K.; Vasavada, A. R.; Nagaraj, R. H.; Glomb, M. A. Comprehensive Analysis of Maillard Protein Modifications in Human Lenses: Effect of Age and Cataract. *Biochemistry* **2015**, *54*, 2500–2507.
- (8) Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Rat Tail Collagen and Correlation to Tendon Stiffening. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3957–3965.
- (9) Biemel, K. M.; Bühler, H. P.; Reihl, O.; Lederer, M. O. Identification and Quantitative Evaluation of the Lysine-Arginine Crosslinks GODIC, MODIC, DODIC, and Glucosepan in Foods. *Food* **2001**, *45*, 210–214.
- (10) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy-D- Erythro -Hexo-2,3-Diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 6458–6464.
- (11) Gaffney, D. O.; Jennings, E. Q.; Anderson, C. C.; Marentette, J. O.; Shi, T.; Schou Oxvig, A.-M.; Streeter, M. D.; Johannsen, M.; Spiegel, D. A.; Chapman, E.; Roede, J. R.; Galligan, J. J. Non-Enzymatic Lysine Lactoylation of Glycolytic Enzymes. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 206–213.
- (12) Zhang, D.; Tang, Z.; Huang, H.; Zhou, G.; Cui, C.; Weng, Y.; Liu, W.; Kim, S.; Lee, S.; Perez-Neut, M.; Ding, J.; Czyn, D.; Hu, R.; Ye, Z.; He, M.; Zheng, Y. G.; Shuman, H. A.; Dai, L.; Ren, B.; Roeder, R. G.; Becker, L.; Zhao, Y. Metabolic Regulation of Gene Expression by Histone Lactylation. *Nature* **2019**, *574*, 575–580.
- (13) Tessier, F. J.; Niquet-Léridon, C.; Jacolot, P.; Jouquand, C.; Genin, M.; Schmidt, A. M.; Grossin, N.; Boulanger, E. Quantitative Assessment of Organ Distribution of Dietary Protein-Bound 13C-Labeled N^ε-Carboxymethyllysine after a Chronic Oral Exposure in Mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 2446–2456.
- (14) Hohmann, C.; Liehr, K.; Henning, C.; Fiedler, R.; Girndt, M.; Gebert, M.; Hulko, M.; Storr, M.; Glomb, M. A. Detection of Free Advanced Glycation End Products in Vivo during Hemodialysis. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 930–937.
- (15) Hellwig, M.; Bunzel, D.; Huch, M.; Franz, C. M. A. P.; Kulling, S. E.; Henle, T. Stability of Individual Maillard Reaction Products in the Presence of the Human Colonic Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 6723–6730.
- (16) Hellwig, M.; Auerbach, C.; Müller, N.; Samuel, P.; Kammann, S.; Beer, F.; Gunzer, F.; Henle, T. Metabolization of the Advanced Glycation End Product N-ε-Carboxymethyllysine (CML) by Different Probiotic *E. coli* Strains. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1963–1972.
- (17) Scheijen, J. L. J. M.; Clevers, E.; Engelen, L.; Dagnelie, P. C.; Brouns, F.; Stehouwer, C. D. A.; Schalkwijk, C. G. Analysis of Advanced Glycation Endproducts in Selected Food Items by Ultra-

Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Presentation of a Dietary AGE Database. *Food Chem.* **2016**, *190*, 1145–1150.

(18) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10017–10026.

(19) Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawney, A. Quantitative Screening of Advanced Glycation Endproducts in Cellular and Extracellular Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Biochem. J.* **2003**, *375*, 581–592.

(20) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes: Characterization and Detection of Lysine–Arginine Cross-Links Derived from Glyoxal and Methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507.

(21) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 1898–1906.

(22) Chen, G.; Scott Smith, J. Determination of Advanced Glycation Endproducts in Cooked Meat Products. *Food Chem.* **2015**, *168*, 190–195.

(23) Yu, L.; Gao, C.; Zeng, M.; He, Z.; Wang, L.; Zhang, S.; Chen, J. Effects of Raw Meat and Process Procedure on N⁶-Carboxymethyllysine and N⁶-Carboxyethyl-Lysine Formation in Meat Products. *Food Sci. Biotechnol.* **2016**, *25*, 1163–1168.

(24) Sun, X.; Li, X.; Tang, J.; Lai, K.; Rasco, B. A.; Huang, Y. Formation of Protein-Bound N⁶-Carboxymethyllysine and N⁶-Carboxyethyllysine in Ground Pork during Commercial Sterilization as affected by the Type and Concentration of Sugars. *Food Chem.* **2021**, *336*, No. 127706.

(25) Chao, P.; Hsu, C.; Yin, M. Analysis of Glycative Products in Sauces and Sauce-Treated Foods. *Food Chem.* **2009**, *113*, 262–266.

(26) Treibmann, S.; Spengler, F.; Degen, J.; Löbner, J.; Henle, T. Studies on the Formation of 3-Deoxyglucosone- and Methylglyoxal-Derived Hydroimidazolones of Creatine during Heat Treatment of Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 5874–5881.

(27) Sun, X.; Tang, J.; Wang, J.; Rasco, B. A.; Lai, K.; Huang, Y. Formation of Free and Protein-Bound Carboxymethyllysine and Carboxyethyllysine in Meats during Commercial Sterilization. *Meat Sci.* **2016**, *116*, 1–7.

(28) Henning, C.; Liehr, K.; Girdt, M.; Ulrich, C.; Glomb, M. A. Extending the Spectrum of α -Dicarbonyl Compounds in Vivo. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 28676–28688.

(29) Maasen, K.; Scheijen, J. L. J. M.; Opperhuizen, A.; Stehouwer, C. D. A.; Van Greevenbroek, M. M.; Schalkwijk, C. G. Quantification of Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods and Drinks; Presentation of a Food Composition Database for Dicarbonyls. *Food Chem.* **2021**, *339*, No. 128063.

(30) Rakete, S.; Glomb, M. A. A Novel Approach for the Quantitation of Carbohydrates in Mash, Wort, and Beer with RP-HPLC Using 1-Naphthylamine for Precolumn Derivatization. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 3828–3833.

(31) Meinert, L.; Schäfer, A.; Bjerregaard, C.; Aaslyng, M. D.; Bredie, W. L. P. Comparison of Glucose, Glucose 6-Phosphate, Ribose, and Mannose as Flavour Precursors in Pork; the Effect of Monosaccharide Addition on Flavour Generation. *Meat Sci.* **2009**, *81*, 419–425.

(32) Meinert, L.; Andersen, L. T.; Bredie, W. L. P.; Bjerregaard, C.; Aaslyng, M. D. Chemical and Sensory Characterisation of Pan-Fried Pork Flavour: Interactions between Raw Meat Quality, Ageing and Frying Temperature. *Meat Sci.* **2007**, *75*, 229–242.

(33) Meinert, L.; Christiansen, S. C.; Kristensen, L.; Bjerregaard, C.; Aaslyng, M. D. Eating Quality of Pork from Pure Breeds and DLY Studied by Focus Group Research and Meat Quality Analyses. *Meat Sci.* **2008**, *80*, 304–314.

(34) Thornalley, P. J. Pharmacology of Methylglyoxal: Formation, Modification of Proteins and Nucleic Acids, and Enzymatic

Detoxification—A Role in Pathogenesis and Antiproliferative Chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **1996**, *27*, 565–573.

(35) Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Formation of Methylglyoxal from Triose Phosphates. Investigation Using a Specific Assay for Methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *212*, 101–105.

(36) Stephens, J. W.; Dikeman, M. E.; Unruh, J. A.; Haub, M. D.; Tokach, M. D.; Dritz, S. S. Effects of Oral Administration of Sodium Citrate or Acetate to Pigs on Blood Parameters, Postmortem Glycolysis, Muscle pH Decline, and Quality Attributes of Pork. *J. Anim. Sci.* **2008**, *86*, 1669–1677.

(37) Stephens, J. W.; Dikeman, M. E.; Unruh, J. A.; Haub, M. D.; Tokach, M. D. Effects of Pre-Rigor Injection of Sodium Citrate or Acetate, or Post-Rigor Injection of Phosphate plus Salt on Post-Mortem Glycolysis, pH, and Pork Quality Attributes. *Meat Sci.* **2006**, *74*, 727–737.

(38) Jiang, Y.; Hengel, M.; Pan, C.; Seiber, J. N.; Shibamoto, T. Determination of Toxic α -Dicarbonyl Compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, Released to the Headspace of Lipid Commodities upon Heat Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1067–1071.

(39) Baldensperger, T.; Glomb, M. A.; Cooper, C. Pathways of Non-Enzymatic Lysine Acylation. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, No. 664553.

(40) Varner, E. L.; Trefely, S.; Bartee, D.; von Krusenstiern, E.; Izzo, L.; Bekeova, C.; O'Connor, R. S.; Seifert, E. L.; Wellen, K. E.; Meier, J. L.; Snyder, N. W. Quantification of Lactoyl-CoA (Lactyl-CoA) by Liquid Chromatography Mass Spectrometry in Mammalian Cells and Tissues. *Open Biol.* **2020**, *10*, No. 200187.

(41) Rabbani, N.; Thornalley, P. J. Methylglyoxal, Glyoxalase 1 and the Dicarbonyl Proteome. *Amino Acids* **2012**, *42*, 1133–1142.

(42) Mclellan, A. C.; Phillips, S. A.; Thornalley, P. J. The Assay of S-D-Lactoylglutathione in Biological Systems. *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 37–43.

(43) Weber, A. L. Formation of the Thioester, N-Acetyl, S-Lactoylcysteine, by Reaction of N-Acetylcysteine with Pyruvaldehyde in Aqueous Solution. *J. Mol. Evol.* **1982**, *18*, 354–359.

10.3 Publikation 3 *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70 (33), 10271-10283JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

pubs.acs.org/JAFC

Article

Lipid Peroxidation Has Major Impact on Malondialdehyde-Derived but Only Minor Influence on Glyoxal and Methylglyoxal-Derived Protein Modifications in Carbohydrate-Rich Foods

Michael D. Eggen, Paul Merboth, Helen Neukirchner, and Marcus A. Glomb*

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70, 10271–10283

Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: In the present work, the contribution of lipid peroxidation on modifications of lysine and arginine residues of proteins was investigated. Lipid peroxidation had a major impact on malondialdehyde-derived protein modifications; however, the influence on glyoxal and methylglyoxal-derived modifications in flat wafers was negligible. Therefore, vegetable oils (either linseed oil, sunflower oil, or coconut oil) were added to respective batters, and flat wafers were baked (150 °C, 3–10 min). Analysis of malondialdehyde indicated oxidation in linseed wafers, which was supported by the direct quantitation of three malondialdehyde protein adducts in the range of 0.09–23.5 mg/kg after enzymatic hydrolysis. In contrast, levels of free glyoxal and methylglyoxal were independent of the type of oil added, which was in line with the analysis of 13 advanced glycation end products. Comprehensive incubations of 40 mM *N*²-*t*-Boc-lysine (100 mM phosphate buffer, pH 7.4) with either 10% oil or an equimolar concentration of carbohydrates led to magnitudes higher (10^3 – 10^5) amounts of *N*⁶-carboxymethyl lysine, *N*⁶-glycolyl lysine, and *N*⁶-carboxyethyl lysine in the latter. Furthermore, malondialdehyde exceeded glyoxal and methylglyoxal in incubations of pure oils at 150 °C by factors of 30 and 100, respectively.

KEYWORDS: lipid peroxidation, malondialdehyde, advanced glycation end products, amidine, glyoxal, methylglyoxal, Maillard reaction

INTRODUCTION

Processing of foods is one crucial aspect regarding protein modification within the Maillard reaction schemes, where fragmentation of carbohydrates but also triose phosphates leads to short-chained 1,2-dicarbonyl structures, with glyoxal and methylglyoxal as important representatives. The subsequent reaction cascade with lysine and arginine residues explains the formation of several stable protein adducts (advanced glycation end products, AGEs) in heated foods. Generally speaking, the daily human intake of AGEs by foods is intensively discussed in connection with the nutritious quality of diets with regard to physiological health aspects of humans.^{1–3}

Previously, we gave insights into the formation of 1,2-dicarbonyl compounds and AGEs during the grilling of porcine meat.⁴ Apart from the carbohydrate chemistry, glyoxal and methylglyoxal were also identified as products of lipid peroxidation and, thus, may contribute to the load of dicarbonyls within the processing of high-fat products like meat.⁵ However, the relevance of this pathway under conditions of food processing is virtually unknown. First mechanistic investigations confirmed secondary lipid peroxidation products including non-2-enal,⁶ 2,4-decadienal,^{7,8} and 2,4-heptadienal⁶ as direct precursors of glyoxal, while methylglyoxal formation is poorly understood. However, specific mechanistic elucidation of 1,2-dicarbonyl formation during lipid peroxidation, for example, by using state-of-the-art methods including isotope-labeled precursors and mass spectrometry, is missing.

In contrast, malondialdehyde (MDA) is a true marker for lipid peroxidation, which is formed especially from unsaturated fatty acids with three and more double bonds.⁹ Similarly to the reactions of 1,2-dicarbonyls, MDA is also highly reactive toward lysine and arginine and in analogy to AGEs, the term advanced lipoxidation end products (ALEs) is frequently used in this regard. The enamine type *N*⁶-propenal lysine [MDA-Lys, 1] and the vinylogue amidine compound *N*⁶-(1-imino-3-aminopropenyl)lysine [MDA-Lys, 2] were identified as reaction products of lysine with MDA in incubations.^{10–12} In contrast, under strong acidic aqueous conditions, the reaction of the guanidine group of arginine with MDA gave *N*⁵-(2-pyrimidinyl)-ornithine [NPO, 5].^{13,14} So far, malondialdehyde protein adducts *in vivo* were only described after acid hydrolysis (Figure 1). While NPO was directly identified in acid hydrolyzed diabetic skin,¹⁵ acid-labile MDA lysine adducts MDA-Lys 1 and MDA-Lys 2 required a prior reduction step with NaBH₄ to give their acid-stable amine derivatives 3 and 4, respectively. Both MDA lysine protein adducts were identified in LDL proteins,¹⁶ while 3 was also quantitated in normal and uremic plasma proteins¹⁷ and a broad range of tissue proteins including heart, kidney, brain, liver, and skeletal muscle.¹⁸

Received: June 9, 2022

Revised: July 27, 2022

Accepted: July 29, 2022

Published: August 15, 2022



ACS Publications

© 2022 The Authors. Published by
American Chemical Society

10271

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04052>
J. Agric. Food Chem. 2022, 70, 10271–10283

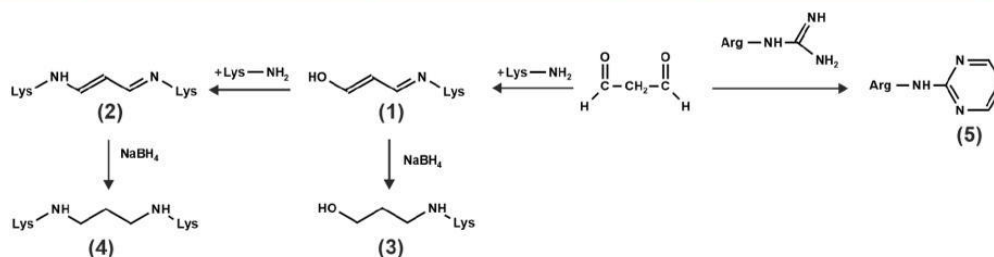


Figure 1. Overview of malondialdehyde-derived protein adducts.

Hitherto, **1** was the only MDA lysine adduct, which was directly identified in enzymatically hydrolyzed foods, at least with the spectrometric methods available at that time.¹⁹

The present work aims to evaluate the influence of lipid peroxidation in respect to glyoxal and methylglyoxal formation in high-fat foods. Consequently, we prepared wafers, which highly differed in the ratio of saturated to unsaturated fatty acid triglycerides. Furthermore, lysine and arginine adducts of MDA were prepared by independent synthesis and quantitated in foods and incubations, which allowed us to quantitatively compare MDA derived ALEs to glyoxal and methylglyoxal derived AGEs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemicals of the highest purity available were obtained from Sigma-Aldrich (Munich/Steinheim, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), Acros Organics (Geel, Belgium), Iris-Biotech (Marktredwitz, Germany), Armar Chemicals (Leipzig, Doettingen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Alfa Aesar (Ward Hill, USA), Grüssing (Filsun, Germany) and TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium) unless otherwise indicated.

Authentic reference material *N*⁶-carboxymethyl lysine (CML),²⁰ *N*⁶-carboxyethyl lysine (CEL), *N*⁶-glycolyl lysine (GALA),²¹ glyoxal lysine amidine (GLA),²² glyoxal lysine dimer (GOLD),²¹ glyoxal derived imidazoline cross-link (GODIC), *N*⁶-lactoyl lysine,²³ methylglyoxal lysine amidine (MGLA),⁴ methylglyoxal lysine dimer (MOLD),²⁴ methylglyoxal derived imidazoline cross-link (MODIC),²⁵ *N*⁷-carboxyethyl arginine, MG-H1, and MG-H3²⁶ were synthesized or isolated from incubations according to the literature. The sodium salt of malondialdehyde was freshly prepared according to previous reports, and spectroscopic data corresponded to that in the literature.²⁷

Synthesis of *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-(Propenal)-lysine. A 2000 mg sample of *N*²-*t*-Boc-L-lysine (8.13 mmol) and 771.6 mg (8.20 mmol) of the sodium salt of malondialdehyde were dissolved in 40 mL of dry methanol. HCl (12 M, 660 μ L) was added, and the reaction mixture was refluxed for 6 h. Volatiles were evaporated, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel, dichloromethane/methanol 2:1, v/v). Materials with *R*_f = 0.47 (silica gel 60, methanol/ethyl acetate, 1:1, UV detection, and hot-dry staining with ninhydrin) were combined and evaporated. The crude product was dissolved in water and subjected to reversed phase column chromatography (Lichoprep C18, water/methanol, 4:6). Fractions containing *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-propenal-lysine (TLC system as described above) were combined, and solvents were instantly concentrated at 40 °C in vacuum and subsequently lyophilized to give 153 mg (0.51 mmol, 6.2%) of *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-propenal-lysine as a slightly yellowish foam. ¹H NMR, (400 MHz, methanol-*d*₄): δ (ppm) = 1.42 (s, 11H), 1.63–1.82 (m, 4H), 3.15 (t, 1.4H, 7.0 Hz), 3.27 (t, 0.6H, 7.0 Hz), 4.06 (m, 1H), 5.24–5.35 (m, 1H), 7.40 (d, 1H, 13.0 Hz), 8.74 (d, 0.3H, 9.0 Hz), 8.82 (d, 0.7H, 9.0 Hz). ¹³C NMR, (100 MHz, methanol-*d*₄): δ (ppm) = 22.9, 27.3, 31.2, 43.0, 48.2, 53.6, 79.0, 99.5, 101.1, 156.7, 159.8, 163.9, 175.2, 189.6, 190.7. HR-MS: *m/z* 301.1750 (found); 301.1758 [calcd for C₁₄H₂₅O₃N₂ (M+H⁺)].

Synthesis of *N*⁶-(Propenal)-lysine, (MDA-Lys). The entire amount of *N*²-*t*-Boc-*N*⁶-propenal-lysine (153 mg) was dissolved in 2 mL of 3 M HCl and stirred at room temperature for 30 min. Then, the acidic solvent was concentrated in vacuum, and the residue was diluted with 3 mL H₂O and subsequently lyophilized to give 101 mg of *N*⁶-propenal lysine as a slightly orange foam in quantitative yield. It is worth noting that the product had residues of lysine, which finally led to 70% purity of the product as determined by HPLC and NMR.

¹H NMR, (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 1.37–1.82 (m, 6H), 3.31 (m, 0.8H), 3.45 (m, 1.2 H), 3.82 (m, 1H), 5.84 (pt, 0.4H), 6.03 (pt, 0.6H), 7.99–8.08 (m, 1H), 8.37 (dd, 0.6H, 11.4 Hz, 14.6 Hz), 8.44 (d, 0.4H, 10.6 Hz), 8.52 (s, 3H), 10.58 (m, 0.4H), 11.72 (m, 0.6H). ¹³C NMR, (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 21.5, 22.0, 27.3, 28.2, 29.5, 44.5, 49.3, 52.1, 99.5, 101.4, 165.0, 169.9, 171.2, 176.0, 181.7. HR-MS: *m/z* 201.1234 (found); 201.1234 [calcd for C₉H₁₇O₃N₂ (M+H⁺)].

Synthesis of *N*²-(2-Pyrimidinyl)-ornithine, (NPO). Synthesis was performed according to King et al. with minor modifications.¹³ Briefly, 383 mg (2.2 mmol) of L-arginine and 585.1 mg (3.25 mmol, 1.5 equiv) of 1,1–3,3-tetramethoxypropane (TMP) were dissolved in 16 mL of concn hydrochloric acid and stirred for 3 h at room temperature. Then, the reaction was quenched with 16 mL of H₂O, and the acidic solvent was removed in vacuum. The crude product was purified by column chromatography (silica gel 60, ethyl acetate/methanol/water, 2:4:1). Materials with *R*_f = 0.30 (silica gel 60, same solvent, hot-dry staining with ninhydrin) were combined and evaporated. The residue was dissolved in H₂O (+1.2 mL/L HFBA) and subjected to a second column chromatography (Lichoprep C18, solvent water/methanol, 7:3, v/v + 1.2 mL/L HFBA). Materials with *R*_f = 0.66 (silica gel 60, *n*-butanol/acetic acid/pyridine/water, 4:3:3:2, hot-dry staining with ninhydrin) were combined and concentrated in vacuum. The residue was lyophilized several times to afford 135 mg (0.215 mmol, 9.8%) of NPO.

¹H NMR, (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 1.72 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 3.46 (t, 2H, 6.8 Hz), 4.0 (t, 1H, 6.4 Hz), 6.91 (t, 1H, 5.5 Hz), 8.44 (s, 2H). ¹³C NMR, (100 MHz, D₂O): δ (ppm) = 23.5, 26.9, 40.5, 52.4, 109.7, 153.9, 171.8. HR-MS: *m/z* 211.1190 (found); 211.1195 [calcd for C₉H₁₅O₂N₄ (M+H⁺)].

***N*²-*t*-Boc-*N*⁶-(1-Amino-3-iminopropen)-lysine, [MDA(*N*²-*t*-Boc-Lys)]₂.** A 900 mg sample (3.65 mmol) *N*²-*t*-Boc-L-lysine (3.65 mmol) and 233.3 mg of sodium salt of malondialdehyde (2.48 mmol, 0.67 equiv) were dissolved in 20 mL of dry methanol under argon, and 103 μ L of 12 M HCl (0.875 mmol, 0.23 equiv) was added. The reaction mixture was heated to reflux for 8 h. Then, solvents were evaporated, and the crude product was purified by column chromatography (silica gel 60, ethyl acetate/methanol, 1:2). Materials with *R*_f = 0.39 (ethyl acetate/methanol, 1:2, hot-dry staining with ninhydrin) were combined, and solvents were removed in vacuum to yield 307 mg (0.58 mmol, 23.4%) of MDA(*N*²-*t*-Boc-Lys)₂. ¹H NMR, (400 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 1.34–1.49 (s, 22H), 1.56–1.85 (m, 8H), 3.26–3.37 (m, 4H), 3.97 (m, 2H), 5.49–5.65 (m, 1H), 7.59–7.77 (m, 2H). ¹³C NMR, (100 MHz, MeOH-*d*₄): δ (ppm) = 22.0, 22.5, 27.3, 29.3, 32.6, 43.4, 43.6, 49.0, 49.2, 55.4, 78.6, 88.5, 90.3, 92.2, 156.2, 160.2, 161.8, 164.0, 165.4, 177.9. HR-MS: *m/z* 529.3251 (found); 529.3237 [calcd for C₂₅H₄₅O₈N₄ (M+H⁺)].

Synthesis of N^6 -(1-Amino-3-iminopropen)-lysine, [MDA(Lys)]₂. The entire amount of MDA(N^2 -*t*-Boc-Lys)₂ (307 mg) was dissolved in 2 mL of 1.5 M HCl and stirred at room temperature for 30 min. Then, solvents were evaporated in vacuum, and the residue was reconstituted in H₂O (+1.2 mL/L HFBA) and subjected to column chromatography (Lichoprep C18, with gradient elution from H₂O to H₂O/MeOH, 7:3, to H₂O/MeOH 3:7, all solvents containing 1.2 mL/L HFBA). Materials with $R_f = 0.27$ (TLC, silica gel 60, *n*-butanol/acetic acid/pyridine/water, 4:3:3:2, hot-dry staining with ninhydrine) were combined, and the organic components were instantly concentrated at 40 °C under reduced pressure and subsequently lyophilized to yield 74 mg (0.22 mmol, 37%) of MDA-Lys₂. ¹H NMR, (400 MHz, D₂O): δ (ppm) = 1.39 (m, 4H), 1.57 (m, 4H), 1.85 (m, 4H), 3.17–3.27 (m, 4H), 3.95 (m, 2H), 5.40 (m, 0.5H), 7.42 (m, 1H), 7.52 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, D₂O): δ (ppm) = 21.2, 21.5, 26.7, 26.8, 28.7, 28.8, 29.2, 29.3, 42.1, 42.9, 48.5, 48.7, 52.7, 88.3, 90.3, 92.1, 160.4, 161.9, 163.7, 165.2, 171.9. HR-MS: m/z 329.2195 (found); 329.2189 [calcd for C₁₅H₂₉O₄N₄ (M + H⁺)].

Determination of UV-Maximum. Two milliliters of TMP [86 μ M in 7.5% trichloroacetic acid (TCA)], and 2 mL of 10 mM 2-thiobarbituric acid (2-TBA) were combined in a screw cap glass vial, vortexed, and incubated either at room temperature for up to 3 days or at 90 °C in an oil bath up to 40 min. Aliquots were regularly taken from the incubation mixtures and appropriately diluted with H₂O before the UV-absorbance was measured at 532 nm using a microplate reader (infinite M200, Tecan, Switzerland) combined with 96-well plates.

Preparations of Flat Wafers. The batters were prepared by weighing 420 g of wheat flour type 405, 235 g of water, 5 g of salt, and 37 g of fat (linseed oil, sunflower oil, or coconut oil) in a stainless-steel bowl and kneaded using a commercial tilt-head stand mixer (Artisan, Kitchen aid Europe, Belgium) for 10 min and stored at 4 °C. For the heat treatment, a downscaled professional wafer baking apparatus (ZQe Mini, Hebenstreit, Moerfelden-Walldorf, Germany) was used. Thirteen grams of batter was heated at 150 °C for 3, 5, 7, and 10 min, respectively, which resulted in about 8 g of the dry flat wafer with a thickness of 1.8 mm and a diameter of 10 cm. Then, samples were homogenized using a mortar before grinding in 35 mL PTFE tubes containing zirconium oxide grinding balls (20 mm) using a mixer mill (Retsch MM400, Germany) at 30 Hz for 30 s.

Determination of Glyoxal and Methylglyoxal. Wafers (200 mg) were weighed in a 2 mL reaction tube and homogenized in 1 mL of water/methanol (1/1, containing 1.6 mM EDTA) using a mixer mill (Retsch MM400, Germany) containing zirconium oxide grinding balls (5 mm) at 30 Hz for 5 min followed by ultrasonic extraction for an additional 5 min at 20 °C. The suspension was derivatized by the addition of 63 μ L of 200 mM aqueous NH₄-formiat solution (pH 3.0) and 110 μ L of aqueous 200 mM *o*-phenylenediamine for 16 h in the dark. Then, 220 μ L of 2 M trifluoroacetic acid was added and samples were incubated for 1 h on ice followed by centrifugation (15000g, 15 min, 4 °C). The supernatant was carefully removed and filtered through a 0.45 μ m cellulose acetate Costar Spin-X filter (Corning, Inc., Corning, Ny). Appropriately diluted samples were subjected to high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC–MS/MS).

Analysis of Malondialdehyde in Wafers. The homogenization step was done as described above for 1,2-dicarbonyl compounds with the exception that proteins were directly precipitated after ultrasonic treatment by the addition of 90 μ L of 50% TCA and incubation for 1 h on ice. Afterward, samples were centrifuged (15000g, 15 min, 4 °C), and 150 μ L of the supernatant was filtered through a 0.45 μ m Costar-Spin-X. The clear solution was derivatized by the addition of 150 μ L of 20 mM 2-TBA for 20 h at 20 °C in the dark. Then, 150 μ L of methanol was added, and samples were subjected to high-pressure liquid chromatography coupled with fluorescent detection (HPLC-FLD). Quantitation of MDA was based on external calibration, which was obtained by the reaction of freshly hydrolyzed TMP with 2-TBA at room temperature in parallel to the samples.

In the case of the alkaline hydrolysis, wafer suspensions were diluted with 91 μ L of 6 M sodium hydroxide to a final concentration of 0.5 M NaOH, followed by incubation in a water bath for 30 min at 60 °C. Then, proteins were precipitated by the addition of 194 μ L of 50% TCA and incubated for 1 h on ice. The steps that followed were identical to that described in the previous section.

Isolation of Proteins. Proteins from wafers were isolated according to an established protein isolation protocol for high-starch foods.²⁸ Briefly, 10 g of respective wafers were defatted according to the literature by adding 30 mL of petroleum ether and shaking for 5 min followed by ultrasonic extraction for 5 min. Afterward, proteins were centrifuged (2000g, 15 min). In sum, the extraction step was repeated three times.²² Afterward, 5 g of defatted wafers was refluxed in 50 mL of isopropanol/water (1:1, v/v) containing 0.5% thioglycerol for 3 h followed by hot centrifugation (7000 g, 15 min). The supernatant was carefully removed, and the residue was extracted once again. Both supernatants were combined and stored at –18 °C in a freezer overnight. The precipitated crude protein pellets were washed two times with cold water and resuspended in 15 mL of water. Then, 100 μ L (14.4 kU) of heat-stable α -amylase was added, and the reaction was refluxed for 30 min (100 °C). Afterward, the reaction was cooled down to 60 °C, and 500 μ L of amyloglucosidase solution (130 U) was added before incubating for an additional 30 min at 60 °C. After the mixture cooled, proteins were precipitated by the addition of 15 mL of –20 °C cold ethanol, and the samples were set overnight in a freezer. The protein pellets were washed two times with water and subsequently lyophilized. The purity of the protein fraction was assessed by the nitrogen content, which was determined by the Kjeldahl method. Finally, 9 mg of the resulting protein powder was suspended in 1.5 mL of phosphate buffered saline [(PBS) 10 mM phosphate and 150 mM sodium chloride] and homogenized using a mixer mill (Retsch MM400, Germany) containing zirconium oxide grinding balls (5 mm) at 30 Hz for 45 min. Aliquots were used for acid and enzymatic hydrolysis.

Acid Hydrolysis. Aliquots of protein suspension (200 μ L), which was equivalent to 1.2 mg of protein, were placed in a screw-cap vial, and 200 μ L of PBS and 100 μ L of sodium borohydride (NaBH₄) solution (15 mg/mL in 0.01 M NaOH) were added. After incubation for 1 h at room temperature, solvents were evaporated in a vacuum concentrator (Savant-Speed-Vac Plus SC110 A combined with a Vapor Trap RVT 400, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). HCl (6 M, 800 μ L) was added, and samples were hydrolyzed at 110 °C for 20 h under an argon atmosphere. The acidic solvent was removed using a vacuum concentrator, and the residue was resuspended in 0.05 mM HCl. After filtration through a 0.45 μ m Spin-X filter, samples were subjected to HPLC–MS/MS. Analysis of amidine structures GLA and MGLA was done as described in the previous section, but reduction with NaBH₄ was omitted.

Enzymatic Hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was done as previously described by Baldensperger et al.²⁹ Briefly, aliquots of protein samples (250 μ L), which were equivalent to 1.5 mg protein, were diluted with 250 μ L of PBS and digested with a mixture of enzymes containing Pronase E (0.3 U, two additions), leucine aminopeptidase (1.0 U), and carboxypeptidase Y (0.95 U). Enzymes were added stepwise, and incubation of each was for 24 h in a shaker incubator at 37 °C. To prevent microbiological growth during incubation a small crystal of thymol was added with the first addition of enzyme. After completion of the digestion procedure, the reaction mixture was filtered through a 3000 Da molecular weight cutoff filter (VWR International, Radnor, PA). Filtrates were appropriately diluted with highly purified water before injection into the HPLC–MS/MS system.

Incubation of Fat Emulsion. A 100 mg aliquot of vegetable oil (either coconut, sunflower, or linseed) was weighed in an 8 mL screw cap vial and 900 μ L of aqueous N^2 -*t*-Boc-lysine solution (40 mM in 100 mM phosphate buffer, pH 7.4) was added. After the addition of a magnetic agitator, reaction tubes were sealed with a PTFE coated cover and heated at 50 °C in an oil bath under vigorous stirring. Aliquots were taken every 24 h and immediately cooled to 4 °C for 30 min followed by centrifugation (4500g, 30 min, 4 °C). The aqueous

Table 1. Mass Spectrometric Parameters for Quantitation of AGEs and 1,2-Dicarbonyl Precursors in Wafer Samples and Incubations

	retention time [min]	precursor ion		product ion 1 ^a			product ion 2 ^b			product ion 3 ^b		
		<i>m/z</i> (amu)	DP ^c [V]	<i>m/z</i> (amu)	CE ^d [eV]	CXP ^e [V]	<i>m/z</i> (amu)	CE [eV]	CXP [V]	<i>m/z</i> (amu)	CE [eV]	CXP [V]
AGE												
CML	10.2	205.2	42	84.1	30.0	14.0	130.0	17.0	9.0	56.1	59.0	9.0
GALA	11.0	205.2	40	142.1	20.0	11.0	84.1	36.0	14.0	159.1	15.0	10.0
N ^ε -lactoyl lysine	14.6	219.2	40	156.2	20.0	8.0	84.1	35.0	9.0	173.1	17.0	8.0
CEL	15.1	219.2	54	84.1	33.0	7.0	130.1	18.0	11.0	56.1	59.0	8.0
CMA	16.9	233.1	55	70.1	42.5	12.0	116.1	23.0	8.0	118.2	22.0	5.5
MDA-Lys	21.3	201.2	50	138.2	20.0	10.0	84.0	30.0	15.0	130.0	20.0	11.0
MGH1/MGH3	22.9	229.2	55	70.1	43.0	12.0	116.1	20.5	9.0	166.2	23.0	12.0
CEA	22.9	247.1	51	70.2	48.0	11.0	116.2	25.0	10.0	132.1	24.0	10.0
NPO	23.4	211.1	60	115.8	19.0	10.0	70.2	36.0	12.0	193.5	14.0	14.0
GOLD	26.8	327.2	60	84.1	51.0	13.0	282.3	31.0	14.0	198.1	28.0	14.0
GLA	27.0	333.2	85	157.1	29.0	10.0	84.1	45.0	14.0	130.0	35.0	6.5
MOLD	28.2	341.3	45	296.3	33.0	18.0	84.1	52.0	14.0	212.3	31.0	17.0
MGLA	28.3	347.2	85	157.1	29.0	12.0	84.1	52.0	10.0	130.0	35.0	10.0
GODIC	29.0	343.3	20	298.4	32.0	8.0	183.2	44.0	13.0	70.2	74.0	11.0
MDA-Lys ₂	29.9	329.3	90	284.2	32.0	16.0	84.1	57.0	6.0	239.3	44.0	17.0
MODIC	30.0	357.3	25	312.2	35.0	7.0	267.3	45.0	15.0	197.4	45.0	14.0
1,2-dicarbonyl quinoxaline												
glyoxal	15.2	131.1	32	77.0	40.0	6.0	104.0	30.0	8.0			
methylglyoxal	16.2	145.0	50	77.0	41.0	5.0	118.1	30.5	7.0	65.0	45.0	5.0

^aMRM transition used for quantification. ^bMRM transition used for confirmation. ^cDelustering potential. ^dCollision energy. ^eCell exit potential.

phase was carefully removed and filtered through a 0.45 μm Spin-X filter.

For the analysis of 1,2-dicarbonyls, aliquots of 100 μL were derivatized with 100 μL of 10 mM *o*-phenylenediamine for 16 h in the dark and subjected to HPLC–MS/MS. In the case of malondialdehyde, a 100 μL sample was adjusted by the addition of 50% TCA to an end concentration of 7.5% TCA before the addition of 118 μL of 10 mM 2-TBA and incubated for 20 h at room temperature in the dark. Then, 118 μL of methanol was added and samples were analyzed by HPLC–FLD.

For the analysis of AGEs, an aliquot of 100 μL was incubated with 100 μL of 6 M HCl for 30 min at room temperature, then the acid solvent was removed in a vacuum concentrator, and the residue was dissolved in water.

Dry Incubation of Fat. A 100 mg aliquot of vegetable oil (either coconut, sunflower, or linseed) was weighed in an 8 mL screw-cap vial, sealed with a PTFE coated cover, and incubated for 23–360 min at 150 $^{\circ}\text{C}$ in a circulation air oven. Then, samples were immediately cooled in a water bath (20 $^{\circ}\text{C}$) for 5 min. Afterward, 900 μL of phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) and a magnetic stir bar was added, and samples were vigorously stirred for 30 min at 40 $^{\circ}\text{C}$. Then, samples were centrifuged (4500g, 30 min, 10 $^{\circ}\text{C}$), and the aqueous phase was carefully removed and filtered through a 0.45 μm Spin-X filter. Aliquots of the clear filtrate were used for the subsequent workup for 1,2-dicarbonyls and malondialdehyde as described in previous sections.

Incubations of Carbohydrates at 50 $^{\circ}\text{C}$. *N*²-*t*-Boc-lysine (40 mM) was incubated with 114 mM carbohydrates (ribose, glucose, lactose, and maltose) in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) under aeration at 50 $^{\circ}\text{C}$ for up to 4 days. Aliquots were mixed with the same volume of 6 M HCl and incubated for 30 min at room temperature. Then, the solvent was removed in vacuum and dried samples were appropriately diluted with H₂O and subjected to HPLC–MS/MS. The amounts of carbohydrates were adjusted according to the molar concentration of linolenic acid triglycerides in fat incubations, which was calculated based on the average molar mass (871 g/mol) obtained from the fatty acid composition.

Stability Experiments of Authentic Reference Standards. *Acid Hydrolysis.* Samples containing 1.2 mg of wafer protein in PBS

buffer were spiked with a mixture of authentic reference standards containing 100 pmol of NPO, MDA-Lys, and MDA-Lys₂. Acid hydrolysis was done without prior NaBH₄ reduction as described in previous sections. For control, the authentic standards were added to separate wafer proteins afterward.

Release of MDA during 2-TBA-derivatization. A 300 μL aliquot of either MDA-Lys, MDA-Lys₂, or NPO (40 μM , in 7.5% TCA) was added to 300 μL of 2-TBA and derivatized for 30 min at 90 $^{\circ}\text{C}$ followed by incubation at room temperature for 19.5 h. In parallel, samples were derivatized at room temperature for 20 h. Then, 300 μL of methanol was added, and the samples were analyzed with HPLC–FLD.

Alkaline Hydrolysis. MDA-Lys, MDA-Lys₂, or NPO were hydrolyzed in 300 μL of 0.5 M NaOH at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Then, the mixture was neutralized by the addition of 25 μL of 6 M HCl and appropriately diluted samples were subjected to HPLC–FLD. Recoveries were determined by external calibration with authentic reference standards.

Extraction of Fat. Ten g of wheat flour type 405 was extracted with 150 mL petroleum ether in a Soxhlet extractor for 2.5 h. Then, the organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and removed in vacuum to yield 98 \pm 3 mg (0.98%) fat. The extraction was done with three independent samples.

Analysis of Fatty Acid Composition. Vegetable oils and fat derived from the flour were analyzed as their fatty acid methyl esters. Briefly, 2 mg of the respective fat was dissolved in 100 μL of *t*-butylmethyl ether, and 50 μL of trimethylsulfonium hydroxide solution (0.25 M in methanol) was added. Samples were derivatized in an ultrasonic bath for 2 min before injection into the GC-system.

The gas chromatograph (Chrompack, CP9000) was equipped with a flame ionization detector (Chrompack 90A FID). Separation was performed on a capillary column (SPR-2380, 30 m \times 0.25 mm, 0.2 μm film thickness, Supelco), with an injector temperature of 260 $^{\circ}\text{C}$ and split ratio of 1:15. Helium 5.0 was used as a carrier gas with a flow velocity of 20 cm/s. The oven program was 40 $^{\circ}\text{C}$ (4 min), 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 100 $^{\circ}\text{C}$ (0 min), 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 160 $^{\circ}\text{C}$ (10 min), 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 225 $^{\circ}\text{C}$ (7 min). Identification of fatty acid methyl esters in the samples was done by comparing retention times with a commercial mixture of authentic fatty acid methyl esters.

Table 2. LOD and LOQ of AGEs and Carbonyl Precursors in Wafer and Incubations

AGE	wafer		incubations	
	LOD ($\mu\text{mol/kg wafer}$)	LOQ ($\mu\text{mol/kg wafer}$)	LOD ($\mu\text{mol/mol lysine}$)	LOQ ($\mu\text{mol/mol lysine}$)
CML	0.015	0.045	0.013	0.041
GALA	0.006	0.018	0.006	0.021
N ^ε -lactoyl lysine	0.007	0.022	n.d.	n.d.
CEL	0.013	0.038	0.008	0.024
CMA	0.021	0.064	n.d.	n.d.
MDA-Lys	0.011	0.034	0.030	0.091
MGH1/MGH3	0.009	0.026	n.d.	n.d.
CEA	0.014	0.042	n.d.	n.d.
NPO	0.020	0.060	n.d.	n.d.
GOLD	0.027	0.083	n.d.	n.d.
GLA	0.020	0.060	n.d.	n.d.
MOLD	0.012	0.035	n.d.	n.d.
MGLA	0.018	0.056	n.d.	n.d.
GODIC	0.039	0.117	n.d.	n.d.
MDA-Lys ₂	0.003	0.008	0.004	0.013
MODIC	0.002	0.007	n.d.	n.d.
carbonyl precursors				
glyoxal ^a	0.034	0.103	0.11	0.33
methylglyoxal ^a	0.008	0.025	0.05	0.16
malondialdehyde ^b	0.06	0.17	0.45	1.35

^aQuinoxaline derivative, HPLC–MS/MS. ^b2-Thiobarbituric acid derivative, HPLC–FLD; n.d. not determined.

HPLC–MS/MS. The HPLC system (Jasco, Groß-Umstadt, Germany) consisted of a pump (PU-2080), a degasser (LG-2080–02), a quaternary gradient pump (LG-2080-04), a column oven (Jasco Jetstream II), and an autosampler (AS-2057 Plus). Mass spectrometric detection was conducted on an API 4000 QTrap LC–MS/MS system (AB Sciex, Concord, ON, Canada) equipped with a turbo ion spray source using electrospray ionization (ESI) in positive mode: sprayer capillary voltage of 2.5 kV, the nebulizing gas flow of 70 mL min^{−1}, heating gas of 80 mL min^{−1} at 650 °C, curtain gas of 40 mL min^{−1}. The optimized mass spectrometric parameters of the analytes are summarized in Table 1. Quantitation was based on the standard addition method. More specifically, increasing concentrations of authentic reference standards at factors 0.25–2 times of the concentration of the analyte in the sample were added to aliquots of the sample. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were calculated at the signal-to-noise of 3 and 9, respectively (Table 2).

Advanced Glycation End Products. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Xselect, HSS T3, 250 mm × 3.0 mm, RP18, 5 μm , Waters, Massachusetts) using a flow rate of 0.7 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 2% B (2 min) to 14% B (10 min) to 87% B (34 min) to 100% B (34.5–41.5 min) to 2% B (44–55 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B) 1.2 mL/L heptafluorobutyric acid was added.

1,2-Dicarbonyl Compounds. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Eurosphere-100, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 μm , Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 10% B (2 min) to 100% B (12–22 min) to 10% B (27–35 min) to 100% B (17–25 min) to 5% B (30–45 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B) 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added.

Analytical HPLC–FLD. Chromatographic separations were performed on a stainless-steel column (Eurosphere-100, 250 mm × 4.6 mm, RP18, 5 μm , Knauer, Germany) using a flow rate of 1.0 mL/min and a column temperature of 25 °C. Samples were injected at 20% B to 30% B (2.5 min) to 100% B (15–21 min) to 20% B (26–35 min). Eluents were water (solvent A) and a mixture of methanol/water (7:3, v/v, solvent B). To both solvents (A and B) 0.6 mL/L heptafluorobutyric acid was added, and the fluorometric detector

excitation and emission wavelengths were set to 525 and 560 nm, respectively.

Analytical HPLC–UV. Chromatographic analysis of malondialdehyde via HPLC–UV (Figure SI-1) was identical to HPLC–FLD, with the only exception of using a UV-detector (UV 2075 Plus, Jasco, Groß-Umstadt, Germany), which was attuned to 532 nm.

High-Resolution Mass Determination (HR-MS). Positive ion high-resolution electrospray ionization (ESI) mass spectra were obtained from an Orbitrap Elite mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) equipped with a heated ESI electrospray ion source (spray voltage 3.5 kV, capillary temperature 275 °C, source heater temperature 40 °C, FTMS resolution > 30,000). Nitrogen was used as sheath and auxiliary gas. The sample solutions were introduced continuously via a 500 μL Hamilton syringe pump with a flow rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The instrument was externally calibrated by Pierce LTQ Velos ESI positive ion calibration solution (product number 88323, ThermoFisher Scientific, Rockford, IL 61105, USA). The data were evaluated by the Xcalibur software 2.7 SP1.

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR). NMR spectra were recorded on VXR 400 spectrometer (Varian, Palo Alto, U.S.A.) operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. SiMe₄ was used as a reference for calibrating the chemical shift.

Statistical Analysis. Generally, in all wafer experiments, for each time point as well as the type of oil three independent wafers were baked and analyzed. Determination of fatty acid composition was done in duplicate. Fat incubations at 50 and 150 °C were done 5-fold and 6-fold, respectively. Recovery rates of malondialdehyde (94% ± 5%), glyoxal (86% ± 7%), and methylglyoxal (73% ± 5%) in wafers were determined by the addition of authentic reference standards before the homogenization step. Each treatment was done at least in triplicate. Differences between the type of oils in wafers were evaluated by using two-sample *t*-test or Welch's *t*-test, respectively, with a probability value of at least 95%.

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis and Chemical Characterization of Malondialdehyde Adducts. Malondialdehyde (MDA) is susceptible to reactions with nucleophiles, for example, lysine and arginine side chains of proteins. As illustrated in Figure 1, the reaction of MDA with lysine gives the vinylogue amide

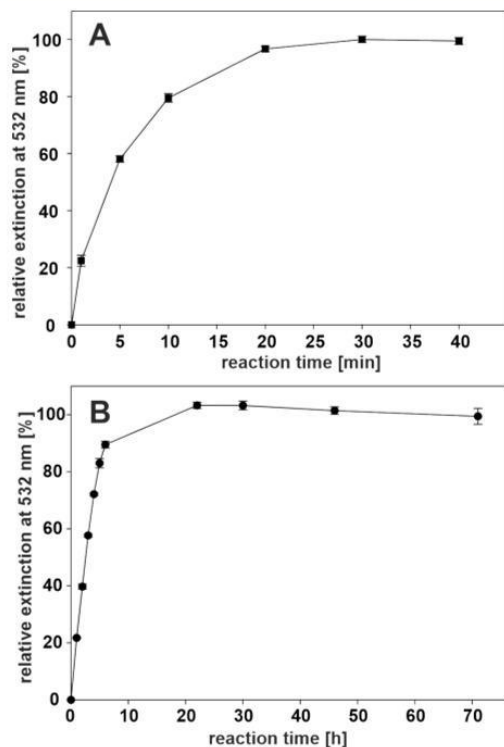


Figure 2. Derivatization kinetics of malondialdehyde and 2-thiobarbituric acid at 90 °C (A) and 20 °C (B).

Table 3. Stability of Malondialdehyde Lysine and Arginine Adducts during the 2-TBA Assay

incubation parameter in 7.5% TCA	release of MDA [%]		
	MDA-Lys	MDA-Lys ₂	NPO
30 min 90 °C + 19.5h 22 °C	14.4 ± 0.7	13.2 ± 0.5	5.9 ± 0.1
20h 22 °C	10.3 ± 0.9	1.6 ± 0.3	1.8 ± 0.2

Table 4. Fatty Acid Composition of Vegetable Oils and Fat Fraction of Wheat Flour

	linseed oil	sunflower oil	coconut oil	flour
lauric acid	<LOD	<LOD	43.0	0.1
myristic acid	0.5	0.5	19.5	0.4
palmitic acid	6.1	7.1	10.6	16.7
stearic acid	5.1	4.5	9.7	0.1
oleic acid	18.6	26.8	2.1	9.7
linoleic acid	12.5	58.4	0.6	56.3
linolenic acid	54.4	0.9	0.6	3.5
arachidonic acid	<LOD	<LOD	<LOD	0.1

structure *N*⁶-propanal lysine [MDA-Lys, **1**], in which the imine bond is stabilized by resonance. Furthermore, another addition of lysine leads to the cross-linking vinylogous amidine structure *N*⁶-(1-amino-3-iminopropen)-lysine [MDA-Lys₂, **2**]. Both malondialdehyde lysine adducts and an additional condensation product with arginine **3** were independently synthesized from incubations of lysine and arginine with malondialdehyde.

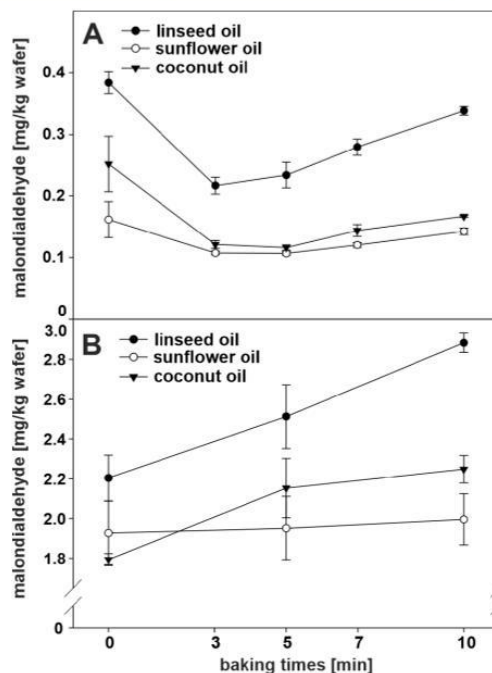


Figure 3. Time dependent changes of malondialdehyde during baking of wafers. Malondialdehyde concentrations in native wafers (A) and alkaline hydrolyzed wafers (B).

Table 5. Stability of MDA-Adducts during Acid and Alkaline Protein Hydrolysis

	recovery of the adducts [%]		
	MDA-Lys	MDA-Lys ₂	NPO
acidic protein hydrolysis (without matrix)	<LOD	<LOD	<LOD
acidic protein hydrolysis (wafer matrix)	<LOD	<LOD	33.4 ± 2.3
alkaline hydrolysis (without matrix)	<LOD	<LOD	88.7 ± 5.6

Structural characterization was done using ¹H NMR, ¹³C NMR, and 2D-NMR homonuclear correlation spectroscopy (H,H-COSY), heteronuclear single quantum coherence (HSQC), and heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) techniques. As expected, an imine- and enamine tautomerism of MDA-Lys and MDA-Lys₂ was indicated by specific splitting signals in ¹H NMR and ¹³C NMR.

With the first attempts, we synthesized and characterized the reduced compound **4**; however, this structure gave a poor chromatographic performance on reversed phase HPLC, and more importantly, the reduction was never quantitative across several approaches treating pure standard **2** with up to a 16-fold molar excess of NaBH₄ in borate buffered solution. Similarly, Requena et al. found that 1 M NaBH₄ led to the maximum yields of **3** and **4** within a row of reduction conditions; however, quantitative information about reaction yields was not given.¹⁶ Thus, we decided to directly analyze malondialdehyde adducts without reduction, and in respect to the lability during acid protein hydrolysis, we used an established enzymatic approach.

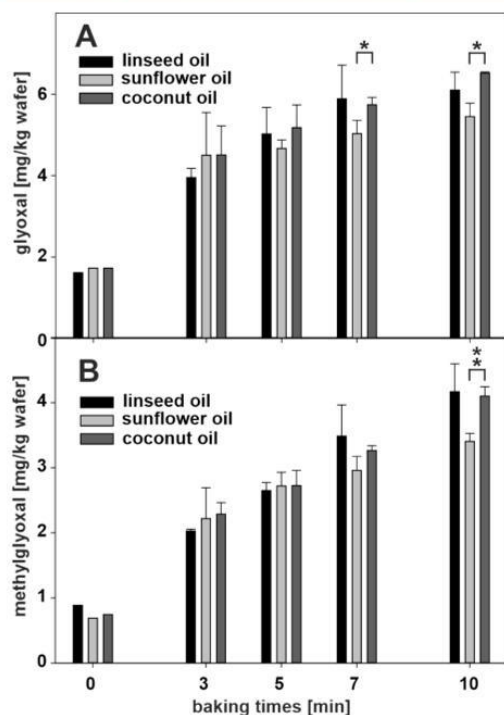


Figure 4. Time dependent changes of glyoxal (A) and methylglyoxal (B) during baking of wafers; statistical significance between different oils at specific time points: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

Determination of Malondialdehyde in Foods and Incubations. Derivatization of malondialdehyde with 2-

thiobarbituric acid (2-TBA) is one of the easiest and most straightforward ways to determine malondialdehyde (MDA) in a broad range of matrices. However, selectivity is frequently discussed in the literature for mainly two reasons: (1) the artificial formation of malondialdehyde from sample ingredients during the harsh assay conditions including the presence of acids and prolonged heating (90–100 °C) and (2) the absorbance of several other short-chained carbonyl adducts coinciding with the maximum of the MDA-thiobarbituric derivative at 532 nm, which was also true for the present wafer matrix. For the latter, HPLC coupling before photometrical detection easily removed disturbing colorimetric substances, and additionally, the condensation product of MDA and 2-thiobarbituric acid was the only fluorescent compound in the wafers, which greatly increased selectivity and sensitivity (Figure SI-1).

Commonly, the established condensation reaction of MDA with 2-TBA includes a heating step in an acidic medium to accelerate the reaction rate. However, reliable and quantitative data about the stability of bound MDA during specifically this harsh derivatization step are missing. Thus, we compared this method with a more gentle approach at room temperature, with a special focus on three representative malondialdehyde amino acid adducts. As shown in Figure 2 derivatization at 90 °C and room temperature both led to the complete reaction of the MDA standard, but room temperature extended the reaction time to about 20 h in good agreement with the literature.³⁰ In contrast, the additional heating step was causal for the higher breakdown rate of MDA-Lys, MDA-Lys₂, and NPO. The release of MDA from heat-treated samples ranged between 6 and 15%, while the same adducts were virtually stable during derivatization at room temperature with MDA-Lys as the only exception (Table 3). It is worth noting, that these results are in contrast to those in the literature, where both the 1:1 and 1:2 adducts of MDA and glycine were quantitatively hydrolyzed under the conditions of the 2-TBA-

Table 6. Time-Dependent Formation of AGEs in Wafer Samples during Baking (150 °C)

AGE	batter mix [mg AGE/kg wafers]/baking time [min]						
	LS ^a /0	LS ^a /5	SF ^b /5	CO ^c /5	LS ^a /10	SF ^b /10	CO ^c /10
Glyoxal Derived							
CML ^d	2.5 ± 0.3	26.4 ± 0.5	27.6 ± 2.2	28.0 ± 0.8	23.5 ± 0.5	26.8 ± 4.6	26.3 ± 0.5
GALA ^e	0.1 ± 0.01	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.3	1.1 ± 1.2	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.4
GLA ^f	<LOD	0.026 ± 0.003	0.027 ± 0.005	0.024 ± 0.007	0.026 ± 0.002	0.034 ± 0.002	0.028 ± 0.005
GOLD ^d	<LOD	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.02
CMA ^e	<LOD	1.9 ± 0.4	1.8 ± 0.5	1.9 ± 0.2	3.9 ± 1.0	4.0 ± 0.7	5.0 ± 0.7
GODIC ^e	<LOD	0.33 ± 0.05	0.40 ± 0.15	0.51 ± 0.09	0.79 ± 0.30	0.90 ± 0.16	1.11 ± 0.21
Methylglyoxal Derived							
CEL ^d	0.45 ± 0.05	11.6 ± 1.02	12.8 ± 0.7	12.8 ± 2.5	13.2 ± 2.6	14.2 ± 2.6	14.1 ± 0.3
N ^ε -lactoyl lysine ^e	0.011 ± 0.002	0.24 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.23 ± 0.06	0.27 ± 0.05	0.33 ± 0.06	0.31 ± 0.08
MGLA ^f	<LOD	0.049 ± 0.006	0.073 ± 0.008	0.049 ± 0.009	0.058 ± 0.008	0.055 ± 0.021	0.057 ± 0.005
MOLD ^d	<LOD	0.18 ± 0.01	0.26 ± 0.06	0.20 ± 0.02	0.27 ± 0.06	0.25 ± 0.06	0.23 ± 0.03
MODIC ^e	<LOD	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.05	0.32 ± 0.07	0.37 ± 0.09	0.32 ± 0.05	0.37 ± 0.07
CEA ^e	2.6 ± 0.6	36.8 ± 4.3	33.5 ± 5.7	42.7 ± 4.7	54.5 ± 8.6	48.7 ± 5.4	56.4 ± 5.5
MGH ₁ /MGH ₃ ^e	1.8 ± 0.3	32.9 ± 3.3	29.3 ± 4.8	37.5 ± 4.2	52.9 ± 9.7	46.0 ± 6.1	51.5 ± 5.7
Malondialdehyde Derived							
MDA-Lys ^e	7.8 ± 2.4	15.0 ± 5.1*	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.1	23.5 ± 7.2*	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1
MDA-Lys ₂ ^e	0.41 ± 0.21	0.78 ± 0.13**	0.20 ± 0.07	0.20 ± 0.04	1.35 ± 0.30**	0.27 ± 0.10	0.22 ± 0.04
NPO ^e	0.09 ± 0.05	0.23 ± 0.11	<LOD	<LOD	0.73 ± 0.14	<LOD	<LOD

^aAddition of linseed oil. ^bAddition of sunflower oil. ^cAddition of coconut oil. ^dAcid hydrolysis with prior NaBH₄ reduction. ^eEnzymatic hydrolysis. ^fAcid hydrolysis without reduction; statistical significance between different oils at specific time points: * $P \leq 0.05$ and ** $P \leq 0.01$.

Table 7. Formation of Dicarbonyl Precursors and AGEs during Incubations of N^2 -*t*-Boc-Lysine in a Fat/Water Emulsion (pH 7.4) at 50°C under Aeration

[h]	glyoxal			methylglyoxal		malondialdehyde		
	GO	CML	GALA	MGO	CEL	MDA	MDA-Lys	MDA-Lys ₂
	$\mu\text{mol/mol lysine}$							
	Linseed Oil							
0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	2.16 ± 0.79	1.11 ± 0.17	0.07 ± 0.02	1.54 ± 0.52	0.28 ± 0.07	3.6 ± 1.1	11.8 ± 1.3	0.42 ± 0.04
48	3.75 ± 0.90	1.84 ± 0.27	0.12 ± 0.02	1.62 ± 0.20	0.37 ± 0.04	19.6 ± 4.9	43.2 ± 9.5	0.57 ± 0.18
96	7.87 ± 2.79	4.46 ± 0.57	0.37 ± 0.05	2.03 ± 0.27	0.56 ± 0.12	79.9 ± 6.5	187.3 ± 41.4	2.70 ± 0.92
	Sunflower Oil							
0	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	0.30 ± 0.11	0.38 ± 0.12	0.029 ± 0.004	0.60 ± 0.28	0.21 ± 0.02	<LOD	<LOD	<LOD
48	0.77 ± 0.29	0.50 ± 0.09	0.050 ± 0.007	0.37 ± 0.10	0.21 ± 0.02	<LOD	6.7 ± 0.5	0.05 ± 0.02
96	1.09 ± 0.54	0.93 ± 0.08	0.083 ± 0.007	0.46 ± 0.07	0.25 ± 0.03	4.5 ± 1.4	19.7 ± 8.6	0.12 ± 0.03
	Coconut Oil							
0	<LOD	<LOD	<LOD	2.09 ± 0.17	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
24	1.67 ± 0.42	2.21 ± 0.08	0.07 ± 0.02	3.43 ± 0.65	0.34 ± 0.08	<LOD	<LOD	<LOD
48	1.63 ± 0.70	2.74 ± 0.49	0.12 ± 0.03	2.75 ± 0.80	0.43 ± 0.06	<LOD	<LOD	<LOD
96	0.53 ± 0.21	3.88 ± 0.71	0.22 ± 0.03	1.12 ± 0.08	0.57 ± 0.10	<LOD	<LOD	<LOD

Table 8. Formation of AGEs in Incubations of N^2 -*t*-Boc-lysine with Different Carbohydrates at 50°C and pH 7.4 under Aeration

incubation time [h]	CML	GALA	CEL
	mmol/mol lysine		
	Glucose		
0	<LOD	<LOD	<LOD
48	6.8 ± 0.5	0.091 ± 0.004	0.19 ± 0.02
96	14.7 ± 4.0	0.187 ± 0.060	0.79 ± 0.24
	Ribose		
0	<LOD	<LOD	<LOD
48	37.8 ± 3.2	0.435 ± 0.028	2.56 ± 0.10
96	45.7 ± 1.0	0.630 ± 0.013	3.08 ± 0.08
	Lactose		
0	<LOD	<LOD	<LOD
48	1.5 ± 0.1	0.016 ± 0.001	0.009 ± 0.001
96	4.7 ± 0.5	0.060 ± 0.005	0.035 ± 0.003
	Maltose		
0	<LOD	<LOD	<LOD
48	3.0 ± 0.1	0.020 ± 0.002	0.0037 ± 0.0002
96	4.7 ± 0.6	0.041 ± 0.003	0.0116 ± 0.0022

assay, which were, however, different to the present report.³¹ To sum up, we decided to consequently analyze MDA after precolumn derivatization with 2-TBA at room temperature using HPLC-FLD.

Preparation of Wafers. In the present work, we prepared three doughs with the addition of 5% coconut oil, sunflower oil, or linseed oil, respectively. The three types of oils differ in their fatty acid composition and specifically in the degree of unsaturation (Table 4). The fat content of flour was about 1%, and thus, the amount of fat added was about 9-fold, finally resulting in 5.8% fat in the batter. For the preparation of the wafers, 12 g of dough was heated for 3, 5, 7, and 10 min at 150 °C using a downscaled version of an industrial wafer machine, which allowed reliable reproducibility concerning wafer morphology and temperature control. As shown in Figure SI-2, baking losses reached a maximum at 3 min and remained stable, consistent with the almost quantitative loss of water. Consequently, in all experiments, raw samples were freeze-

dried before analysis and, thus, the values of protein modifications and carbonyls were given as mg/kg dry matter. Peroxide values of pure linseed oil (5.34 ± 0.27 mmol/kg), sunflower oil (1.74 ± 0.06 mmol/kg), and coconut oil (0.55 ± 0.06 mmol/kg) were determined before oxidation experiments according to a national reference method (DIN EN ISO 3960:2017-05).

Analysis of Malondialdehyde with 2-Thiobarbituric Acid in Wafers. We chose malondialdehyde as a true marker for lipid peroxidation in wafers. Malondialdehyde is an established oxidation marker of thermal treatments of vegetable oils and rose with higher unsaturation, prolong incubation time, and temperature.³² As shown in Figure 3A, addition of all oils gave similar curve characteristics, with levels of MDA in raw dough being the highest, while baking led to a decrease to about a half. Between 3 and 10 min, MDA levels of wafers baked with linseed oil rose to approximately 90% of the starting values, while wafers of coconut oil and sunflower oil gave only slight increases.

The decrease of MDA within the first minutes can be easily explained by condensation reactions with protein side chains. One way to determine bound MDA is alkaline hydrolysis, in which the samples are incubated in 0.5 M NaOH at 60 °C for 30 min. Hydrolyzed wafer samples gave a factor of about 5–8 more MDA and revealed a linear correlation with the baking time for linseed oil (Figure 3B). In contrast, sunflower oil remained nearly at constant levels, while coconut oil revealed an unexpected moderate positive trend. These results were in good agreement with those in the literature, where initial levels of MDA in plasma protein samples raised about 10-fold after alkaline hydrolysis.³³

So far, reliable and quantitative information about structural types of malondialdehyde adducts susceptible to alkaline hydrolysis are virtually unknown and in first experiments, we hydrolyzed modified lysine and arginine, which were obtained by prior incubation with MDA. Changes between native and hydrolyzed samples were monitored by HPLC-FLD after *o*-phthalaldehyde postcolumn derivatization and structural information on individual peaks was obtained via HPLC-MS/MS, which gave us first hints for MDA-Lys and MDA-Lys₂ being responsible for the increase of MDA. Finally, this

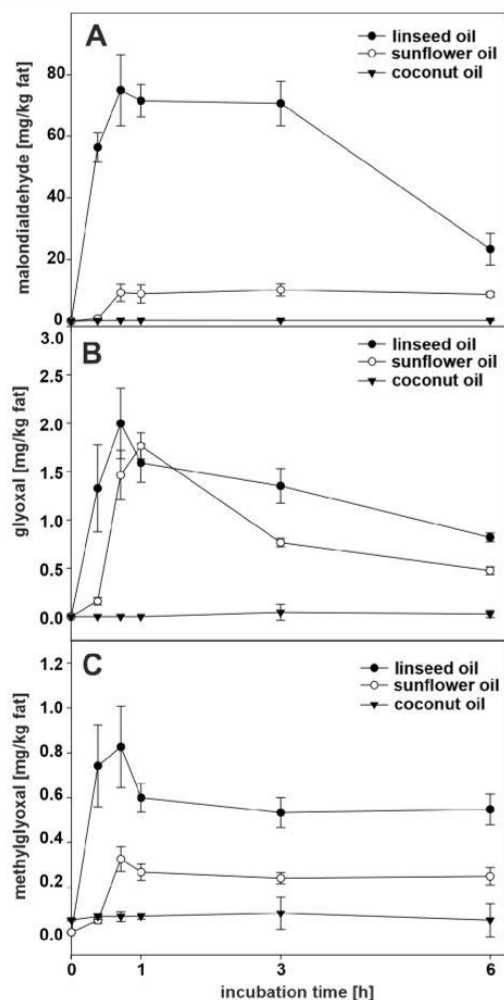


Figure 5. Time dependent changes of malondialdehyde (A), glyoxal (B), and methylglyoxal (C) during the dry incubation of vegetable oils at 150 °C.

hypothesis was confirmed through stability experiments using pure authentic standards, however, which showed in contrast that the arginine adduct NPO was almost stable (Table 5). Thus, based on these results, we propose that MDA is primarily bound to lysine residues during baking, which was supported by the direct quantitation of the aforementioned adducts in wafer proteins, as discussed below. It is well-known from the literature that MDA stems primarily from polyunsaturated fatty acids with three or more double bonds; thus, as expected, linseed oil with more than 56% linolenic acid (Table 4) yielded the highest amounts of MDA.⁹ On the other side, MDA formation was also reported after oxidation of linoleic acid and oleic acid at 170 °C.³⁴ However, linoleic acid is a much poorer precursor for MDA.^{9,34} Nevertheless, the nearly identical values of coconut oil and sunflower oil in Figure 3 were somewhat surprising in sights of more than 58% linoleic acid of the latter. Obviously, the MDA levels of

coconut oil wafers must be traced back to oxidation of 3.5% linolenic acid and 56% linoleic acid in the fat fraction of the flour (Table 4). In addition, within the present experimental setup oils were directly used instead of pure fatty acids, and, consequently, also minor natural ingredients including antioxidants as tocopherols are present. This will have a major impact on the susceptibility to lipid peroxidation. While concentrations of tocopherols in coconut oils are negligible, sunflower oils reach up to 590 mg of α -tocopherol/kg fat, which explains the suppression of oxidations with the lowest MDA-concentrations depicted in Figure 3.³⁵

Determination of Glyoxal and Methylglyoxal in Wafers. In contrast to the results of MDA, all wafers gave the same trends with virtually identical absolute values for 1,2-dicarbonyls, which ranged between 4 and 6 mg/kg wafer for glyoxal and 2–4 mg/kg for methylglyoxal throughout all time points (Figure 4). However, for sunflower oil baked wafers at 10 min slightly lower values of methylglyoxal were recorded. These values were similar in magnitude to wheat bread rolls; however, for that case the ratio of methylglyoxal to glyoxal of about 2:1 was argued by the enzymatic production of methylglyoxal precursors by yeast.²⁸ Taken together, the present data suggests that both glyoxal and methylglyoxal stem from carbohydrate fragmentation rather than from fat oxidation in wafers.

Analysis of Advanced Glycation End Products in Wafers. Proteins were isolated according to an established protocol for high starch foods containing steps of defatting, extraction with water/isopropanol, and enzymatic starch hydrolysis. Because of the similar matrix, yields and purity of the wafer protein fractions were identical to that in the literature, and thus, the subsequent work up including enzymatic and acid protein hydrolyses was applicable.²⁸

In full support to the results for free dicarbonyls, all wafers gave nearly identical pictures of glyoxal as well as methylglyoxal derived AGEs, independently of the type of oil added to the dough (Table 6). This suggested, that the time-dependent increase of AGEs of the wafers must be traced back to the Maillard catalyzed breakdown of carbohydrates. Directly compared to data for nonfermented crispbread, the absolute values for wafers were 2-fold higher, while the relative ratios of the AGEs were nearly identical.²⁸

In raw samples, glyoxal AGEs CML and GALA were quantitated with values of about 2.5 and 0.1 mg/kg and increased by a factor of about 10 after 5 min baking, while the initial levels of the corresponding methylglyoxal AGEs CEL (0.45 mg/kg) and N^6 -lactoyl lysine (0.01 mg/kg) rose by a factor of about 20–25.

Similarly, the cross-link compounds GOLD, MOLD, and MODIC were quantitated in 5 min baked wafers and only slightly increased after 10 min, with GODIC as an exception which was doubled. Preliminary research from our working group revealed GLA and MGLA as two representatives for the novel amidine AGE class in incubations and also in meat proteins. Within the present work, we also identified these novel amidine structures in wafer proteins. However, the absolute levels of GLA and MGLA were about factors of 4–6 lower compared to the corresponding imidazole cross-links GOLD and MOLD, which was also true for previous findings in meat protein and incubations.^{4,22}

Analytics of Malondialdehyde Protein Adducts. In respect of the lability of MDA-Lys, MDA-Lys₂, and NPO as representatives for MDA protein adducts during acid protein

hydrolysis (Table 5), we used an established enzymatic approach including a mixture of endo- and exopeptidases before HPLC–MS/MS analysis. To the best of our knowledge, this is the first time where MDA protein reaction products were quantitated directly in thermally treated foods.

As depicted in Table 6, MDA-Lys was the major MDA-adduct in the raw dough of linseed oil with values of about 7.8 mg/kg, and baking for 5 and 10 min gave doubled and tripled levels, respectively. Similarly, initial levels of MDA-Lys₂ (0.41 mg/kg) and NPO (0.09 mg/kg) increased nearly linear and reached final concentrations of 1.35 mg/kg and 0.73 mg/kg, respectively. In contrast, sunflower and coconut oil had much lower concentrations of MDA-Lys and MDA-Lys₂, which slightly increased with the baking times in full support with levels of free and hydrolyzed MDA (Figure 3).

Thus, the decrease of free MDA within the first minutes has to be ascribed to condensation reactions particularly with lysine residues to give MDA-Lys, which also explained the release of malondialdehyde during alkaline hydrolysis of wafers. Based on a quantitative manner, MDA-Lys in linseed wafers was in the range of established Maillard derived modifications CML and CEL, suggesting that proteins of high-fat foods are indeed modified by lipid-derived carbonyls as MDA. To get further information about absolute amounts of carbonyls formed through lipid peroxidation and to confirm our results of the wafer model, we simplified the incubation setup in the next step by solely using pure oils.

Formation of Dicarboxyls and Lysine Modifications in Fat Incubations. So far, the generation of glyoxal and methylglyoxal was measured during the irradiation of squalene,³⁶ thermal treatment of vegetable oils and fats,^{37,38} and incubations of polyunsaturated fatty acids at room temperature with a Fe²⁺/ascorbate oxidation systems.³⁹ However, the latter setup should be critically discussed because ascorbic acid will significantly contribute to the pool of carbonyl species due to its high potencies for fragmentation under oxidative conditions.^{40,41} A second major problem is that glyoxal was often indirectly quantitated as CML in reaction mixtures containing pure fatty acids and proteins or lysine, respectively, where values of CML correlated with the degree of unsaturation.^{42,43} However, from a mechanistic point of view, CML will indeed stem from glyoxal in fat incubations, while in complex food matrices several other pathways will contribute such as Maillard catalyzed carbohydrate fragmentation. Consequently we used the amide structure GALA as a true indicator of glyoxal derived protein modifications, but quantitated also CML for comparability reasons.²¹

Thus, to dissect the contribution of lipid peroxidation especially to glyoxal and methylglyoxal mediated AGE formation a carbohydrate-free model reaction system was chosen. In the first experiments, an emulsion containing an aqueous phase (40 mM N²-t-Boc-lysine, 100 mM phosphate, pH 7.4) and an organic phase consisting of 10% (w/w) either sunflower oil, linseed oil, or coconut fat was generated by vigorous stirring and heating at 50 °C of the materials for up to 4 days. As expected, malondialdehyde was the leading dicarbonyl to reach about 80 μmol/mol lysine with linseed oil, which entailed the linear increase of MDA-Lys (187 μmol/mol lysine) and a minor amount of MDA-Lys₂ (2.70 μmol/mol lysine) (Table 7). In contrast, the other oils were virtually stable within the first 2 days. After 4 days, the sunflower oil mixtures reached about 4.5 μmol malondialdehyde/mol lysine

and 19.7 μmol MDA-Lys/mol lysine, which was about a factor of 10–17 lower compared to that obtained by the linseed oil.

Similarly, glyoxal and methylglyoxal formation as well as related lysine adducts correlated with the degree of unsaturation. Linseed oil reached up to 7.87 μmol glyoxal/mol lysine after 96 h, which was accompanied by the linear increase of CML and GALA to yield final levels of 4.46 and 0.37 μmol/mol lysine, respectively. To a lower degree, methylglyoxal also increased, with final levels being about a quarter of glyoxal, consistent with CEL being about one-tenth. In sunflower oil, levels of 1,2-dicarbonyls and AGEs were minor by about a factor 5–7, with glyoxal slightly increasing and even smaller concentrations of methylglyoxal and CEL also almost remaining constant. Unexpectedly, coconut oil showed already small amounts of glyoxal and methylglyoxal at the starting point of the experiment, which subsequently decreased and correlated to slight increases of CML, GALA, and CEL. Obviously, the residual primary carbonyl concentrations might be related to the refining technology of the commercial product, while the oxidation experiment never led to measurable increases.

To evaluate this data to carbohydrates as major sources of AGE formation, we incubated fat comparable concentrations of different carbohydrates and quantitated glyoxal and methylglyoxal derived AGEs (Table 8). The reactivity of selected carbohydrates was according to the literature, and final yields after 96 h incubation time were magnitudes higher for CML (10³–10⁴) but also for glyoxal specific GALA (10²–10³) compared to the previously mentioned linseed oil setup.²² Similar results were obtained for CEL, however, with much smaller yields for lactose and maltose, which were still higher by factors of 20–60 compared to fat incubations. This led to the conclusion that at least in our setup fats are only of negligible impact on the formation of glyoxal and methylglyoxal related AGEs. The relevance of fat oxidation with respect to glyoxal and CML formation directly compared to carbohydrate chemistry is indeed contradictory as discussed in the literature. While Fu et al. gave higher values of CML in incubations of unsaturated fatty acids including arachidonic acid and linolenic acid compared to glucose,⁴² others declared the opposite.^{43,44} For instance, Lima et al. gave about 20-fold higher values of CML in incubations of casein with glucose compared to equimolar arachidonic acid. Nevertheless, loss of lysine was higher in incubations of the latter, suggesting that secondary fat oxidation products were highly abundant and reacted with lysine to give a variety of ALE rather than glyoxal specific CML.⁴³

While the incubations at 50 °C dealt rather with mechanistic relationships and gave comparability to the literature, we increased the temperature up to 150 °C in a second set of experiments, with more focus to mimic typical processing temperatures of foods during for example, baking and frying. Concerning the partial volatility of target analytes, we decided to use vials that were sealed with polytetrafluoroethylene (PTFE) coated covers. In full support of the results of the above 50 °C fat incubation, the correlation between the levels of carbonyls and the degree of unsaturation of the vegetable oils was confirmed. The higher temperature of 150 °C led to an increase of the maximum amounts of dicarbonyls by factors of 33–39 (MDA), 12–62 (glyoxal), and 13–45 (methylglyoxal), respectively (Figure 5). MDA in linseed oil highly increased within the first 45 min to reach 75 mg/kg fat, and remained constant to 3 h and then decreased to 23 mg/kg fat.

This may be attributed to the high reactivities of carbonyl compounds under the present conditions, which make them susceptible to further reactions, for example, condensation and oxidation reactions. Similar curves were also monitored for glyoxal and methylglyoxal, while the absolute levels were about factors of 30 and 100 lower compared to MDA.

Again, MDA levels in coconut oil incubations were below the limit of detection, while sunflower oil gave a time-delayed increase with final yields of about a tenth compared to linseed oil after 45 min. Here, up to 20 min only traces of MDA were generated from sunflower oil, which supported our findings in wafers, where sunflower wafers baked for 10 min had nearly identical MDA values as the wafers baked with coconut oil (Figure 3). Thus, based on MDA as a marker sunflower oil is virtually stable against oxidation for up to 40 min at 150 °C. This was also true for glyoxal and methylglyoxal, but interestingly, sunflower oil reached maximum yields of glyoxal (1.8 mg/kg fat), nearly identical to linseed oil (2.0 mg/kg fat). Several working groups previously determined glyoxal and methylglyoxal in heated vegetable oils, and results ranged between 0.01 and 12.5 mg/kg oil for glyoxal and 0.13–5 mg/kg oil for methylglyoxal, respectively.^{37,45,46} However, a direct comparison of these results with the present work is challenging because of differences in the chosen type of oils and the experimental setup.

To sum up, based on a complex food model but also various simple incubations, we concluded the relevance of the lipid peroxidation pathway to be negligible regarding the formation of glyoxal and methylglyoxal in relation to the Maillard induced carbohydrate degradation leading to protein modifications. On the other hand, quantitation of MDA adducts gave first hints of the remarkable relevance of other carbonyl compounds specific for lipid peroxidation in high-fat foods. In wafers made from dough with high content of linolenic acid, concentrations of monovalent vinylogue MDA lysine amid reached 23 mg/kg comparable to typical Maillard products such as N⁶-carboxymethyl lysine and N⁶-carboxyethyl lysine. The comprehensive quantitation of protein modifications derived from other fat-specific carbonyls including 4-hydroxynonenal, acrolein, malondialdehyde, and hexanal is now a topic to further clarify the impact of lipid peroxidation on overall protein modifications.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c04052>.

HPLC-chromatograms: authentic reference standard (A), exemplary chromatogram of malondialdehyde from a wafer workup after precolumn derivatization with 2-thiobarbituric acid with (B) fluorescence detection (ex 525 nm, em 560 nm) and (C) UV-detection at 532 nm; weight losses during the baking of wafers(PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Marcus A. Glomb – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Saale, Germany*; orcid.org/0000-0001-8826-0808; Email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: ++049-345-5527341

Authors

Michael D. Eggen – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Saale, Germany*; orcid.org/0000-0002-9332-7373

Paul Merboth – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Saale, Germany*

Helen Neukirchner – *Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Saale, Germany*

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.2c04052>

Funding

Funding was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, Germany) Research Training Group 2155–2, ProMoAge.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. D. Ströhl from the Institute of Organic Chemistry, Halle, Germany, for recording NMR spectra and A. Laub from the Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Halle, Germany, for performing accurate mass analysis.

■ ABBREVIATIONS USED

AGEs, advanced glycation end products; ALEs, advanced lipoxidation end products; CML, N^ε-carboxymethyl lysine; CEL, N^ε-carboxyethyl lysine; GO, glyoxal; GLA, glyoxal lysine amidine; GALA, N^ε-glycolyl lysine; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link; GOLD, glyoxal lysine dimer; GODIC, glyoxal-derived imidazoline cross-link; GLA, glyoxal lysine amidine; HPLC-FLD, high-pressure liquid chromatography coupled with fluorescent detection; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantitation; MDA-Lys, N⁶-propenal-lysine; MDA-Lys₂, N⁶-(1-amino-3-iminopropen)-lysine; MGLA, methylglyoxal lysine amidine; MGO, methylglyoxal; MOLD, methylglyoxal lysine dimer; MODIC, methylglyoxal-derived imidazoline cross-link; NPO, N⁵-(2-pyrimidinyl)-ornithine; PBS, phosphate buffered saline; PTFE, polytetrafluoroethylene; 2-TBA, 2-thiobarbituric acid; TMP, 1,1,3,3-tetramethoxypropane; TCA, trichloroacetic acid.

■ REFERENCES

- (1) Lund, M. N.; Ray, C. A. Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (23), 4537–4552.
- (2) Zhu, Y.; Snooks, H.; Sang, S. Complexity of Advanced Glycation End Products in Foods: Where Are We Now? *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (6), 1325–1329.
- (3) Henle, T. Protein-Bound Advanced Glycation Endproducts (AGEs) as Bioactive Amino Acid Derivatives in Foods. *Amino Acids* **2005**, *29* (4), 313–322.
- (4) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Analysis of Glyoxal- and Methylglyoxal-Derived Advanced Glycation End Products during Grilling of Porcine Meat. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (50), 15374–15383.
- (5) Suh, J. H.; Niu, Y. S.; Hung, W.-L.; Ho, C.-T.; Wang, Y. Lipidomic Analysis for Carbonyl Species Derived from Fish Oil Using

- Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2017**, *168*, 31–42.
- (6) Lillard, D. A.; Day, E. A. Degradation of Monocarboxyls from Autoxidizing Lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1964**, *41* (8), 549–552.
- (7) Matthews, R. F.; Scanlan, R. A.; Libbey, L. M. Autoxidation Products of 2,4-Decadienal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1971**, *48* (11), 745–747.
- (8) Michalski, S. T.; Hammond, E. G. Use of Labeled Compounds to Study the Mechanism of Flavor Formation in Oxidizing Fats. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1972**, *49* (10), 563–566.
- (9) Esterbauer, H.; Schaur, R. J.; Zollner, H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* **1991**, *11* (1), 81–128.
- (10) Nair, V.; Vietti, D. E.; Cooper, C. S. Degenerative Chemistry of Malondialdehyde. Structure, Stereochemistry, and Kinetics of Formation of Enaminals from Reaction with Amino Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103* (11), 3030–3036.
- (11) Itakura, K.; Uchida, K. Evidence That Malondialdehyde-Derived Aminoimine Is Not a Fluorescent Age Pigment. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (5), 473–475.
- (12) Nair, V.; Cooper, C. S.; Vietti, D. E.; Turner, G. A. The Chemistry of Lipid Peroxidation Metabolites: Crosslinking Reactions of Malondialdehyde. *Lipids* **1986**, *21* (1), 6–10.
- (13) King, T. P. Selective Chemical Modification of Arginyl Residues. *Biochemistry* **1966**, *5* (11), 3454–3459.
- (14) Foettinger, A.; Leitner, A.; Lindner, W. Derivatization of Arginine Residues with Malondialdehyde for the Analysis of Peptides and Protein Digests by LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (5), 623–632.
- (15) Slatter, D. A.; Paul, R. G.; Murray, M.; Bailey, A. J. Reactions of Lipid-Derived Malondialdehyde with Collagen. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (28), 19661–19669.
- (16) Requena, J. R.; Fu, M. X.; Ahmed, M. U.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. Quantification of Malondialdehyde and 4-Hydroxynonenal Adducts to Lysine Residues in Native and Oxidized Human Low-Density Lipoprotein. *Biochem. J.* **1997**, *322* (1), 317–325.
- (17) Miyata, T.; Fu, M. X.; Kurokawa, K.; Van Ypersele De Strihou, C.; Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. Autoxidation Products of Both Carbohydrates and Lipids Are Increased in Uremic Plasma: Is There Oxidative Stress in Uremia? *Kidney Int.* **1998**, *54* (4), 1290–1295.
- (18) Jové, M.; Mota-Martorell, N.; Pamplona, R.; Pradas, I.; Martin-Gari, M.; Ayala, V.; Pamplona, R. The Advanced Lipoxidation End-Product Malondialdehyde-Lysine in Aging and Longevity. *Antioxidants* **2020**, *9* (11), 1132.
- (19) Piche, L. A.; Cole, P. D.; Hadley, M.; Van Den Bergh, R.; Draper, H. H. Identification of N^ε-(2-Propenal)Lysine as the Main Form of Malondialdehyde in Food Digesta. *Carcinogenesis* **1988**, *9* (3), 473–477.
- (20) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of Protein Modification by Glyoxal and Glycolaldehyde, Reactive Intermediates of the Maillard Reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270* (17), 10017–10026.
- (21) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (45), 41638–41647.
- (22) Eggen, M. D.; Glomb, M. A. Novel Amidine Protein Cross-Links Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (28), 7960–7968.
- (23) Smuda, M.; Voigt, M.; Glomb, M. A. Degradation of 1-Deoxy-d-Erythro-Hexo-2,3-Diulose in the Presence of Lysine Leads to Formation of Carboxylic Acid Amides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (10), 6458–6464.
- (24) Thornalley, P. J.; Battah, S.; Ahmed, N.; Karachalias, N.; Agalou, S.; Babaei-Jadidi, R.; Dawnay, A. Quantitative Screening of Advanced Glycation Endproducts in Cellular and Extracellular Proteins by Tandem Mass Spectrometry. *Biochem. J.* **2003**, *375* (3), 581–592.
- (25) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-Linking of Proteins by Maillard Processes: Characterization and Detection of Lysine–Arginine Cross-Links Derived from Glyoxal and Methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7* (11), 2499–2507.
- (26) Klöpfer, A.; Spanneberg, R.; Glomb, M. A. Formation of Arginine Modifications in a Model System of N^ε-Tert -Butoxycarbonyl (Boc)-Arginine with Methylglyoxal. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (1), 394–401.
- (27) Marnett, L. J.; Bienkowski, M. J.; Raban, M.; Tuttle, M. A. Studies of the Hydrolysis of 14C-Labeled Tetraethoxypropane to Malondialdehyde. *Anal. Biochem.* **1979**, *99* (2), 458–463.
- (28) Jost, T.; Henning, C.; Heymann, T.; Glomb, M. A. Comprehensive Analyses of Carbohydrates, 1,2-Dicarbonyl Compounds, and Advanced Glycation End Products in Industrial Bread Making. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (12), 3720–3731.
- (29) Baldensperger, T.; Jost, T.; Zipprich, A.; Glomb, M. A. Novel α -Oxoamide Advanced-Glycation Endproducts within the N⁶-Carboxymethyl Lysine and N⁶-Carboxyethyl Lysine Reaction Cascades. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (8), 1898–1906.
- (30) Tarladgis, B. G.; Pearson, A. M.; Jun, L. R. D. Chemistry of the 2-thiobarbituric Acid Test for Determination of Oxidative Rancidity in Foods. II.—Formation of the Tba-malonaldehyde Complex without Acid-heat Treatment. *J. Sci. Food Agric.* **1964**, *15* (9), 602–607.
- (31) Buttkus, H.; Bose, R. J. Amine-Malonaldehyde Condensation Products and Their Relative Color Contribution in the Thiobarbituric Acid Test. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1972**, *49* (7), 440–443.
- (32) Ma, L.; Liu, G. Simultaneous Analysis of Malondialdehyde, 4-Hydroxy-2-Hexenal, and 4-Hydroxy-2-Nonenal in Vegetable Oil by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (S1), 11320–11328.
- (33) Cighetti, G.; Debiasi, S.; Paroni, R.; Allevi, P. Free and Total Malondialdehyde Assessment in Biological Matrices by Gas Chromatography–Mass Spectrometry: What Is Needed for an Accurate Detection. *Anal. Biochem.* **1999**, *266* (2), 222–229.
- (34) Kishida, E.; Tokumaru, S.; Ishitani, Y.; Yamamoto, M.; Oribe, M.; Iguchi, H.; Kojo, S. Comparison of the Formation of Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances from Autoxidized Fatty Acids Based on Oxygen Consumption. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41* (10), 1598–1600.
- (35) Schwartz, H.; Ollilainen, V.; Piironen, V.; Lampi, A.-M. Tocopherol, Tocotrienol and Plant Sterol Contents of Vegetable Oils and Industrial Fats. *J. Food Compos. Anal.* **2008**, *21* (2), 152–161.
- (36) Niyati-Shirkhodae, F.; Shibamoto, T. Gas Chromatographic Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal Formed from Lipids and Related Compounds upon Ultraviolet Irradiation. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41* (2), 227–230.
- (37) Jiang, Y.; Hengel, M.; Pan, C.; Seiber, J. N.; Shibamoto, T. Determination of Toxic α -Dicarbonyl Compounds, Glyoxal, Methylglyoxal, and Diacetyl, Released to the Headspace of Lipid Commodities upon Heat Treatment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (5), 1067–1071.
- (38) Fujioka, K.; Shibamoto, T. Formation of Genotoxic Dicarbonyl Compounds in Dietary Oils upon Oxidation. *Lipids* **2004**, *39* (5), 481–486.
- (39) Mlakar, A.; Spittler, G. Previously Unknown Aldehydic Lipid Peroxidation Compounds of Arachidonic Acid. *Chem. Phys. Lipids* **1996**, *79* (1), 47–53.
- (40) Mlakar, A.; Batna, A.; Dudda, A.; Spittler, G. Iron (II) Ions Induced Oxidation of Ascorbic Acid and Glucose. *Free Radic. Res.* **1996**, *25* (6), 525–539.
- (41) Smuda, M.; Glomb, M. A. Maillard Degradation Pathways of Vitamin C. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2013**, *52* (18), 4887–4891.
- (42) Fu, M.-X.; Requena, J. R.; Jenkins, A. J.; Lyons, T. J.; Baynes, J. W.; Thorpe, S. R. The Advanced Glycation End Product, N^ε-(Carboxymethyl)Lysine, Is a Product of Both Lipid Peroxidation and Glycoxidation Reactions. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (17), 9982–9986.

(43) Lima, M.; Assar, S. H.; Ames, J. M. Formation of N^ε-(Carboxymethyl)Lysine and Loss of Lysine in Casein Glucose–Fatty Acid Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (3), 1954–1958.

(44) Yu, L.; Chai, M.; Zeng, M.; He, Z.; Chen, J. Effect of Lipid Oxidation on the Formation of N^ε-Carboxymethyl-Lysine and N^ε-Carboxyethyl-Lysine in Chinese-Style Sausage during Storage. *Food Chem.* **2018**, *269*, 466–472.

(45) Hirayama, T.; Yamada, N.; Nohara, M.; Fukui, S. The Existence of the 1,2-dicarbonyl Compounds Glyoxal, Methyl Glyoxal and Diacetyl in Autoxidised Edible Oils. *J. Sci. Food Agric.* **1984**, *35* (12), 1357–1362.

(46) Lu, Y.; Lu, M.; Wang, J.; Jiang, X.; Lu, Y.; Qiu, C.; Lv, L.; Dong, W. Inhibitory Activity on the Formation of Reactive Carbonyl Species in Edible Oil by Synthetic Polyphenol Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **2021**, *69* (32), 9025–9033.

Recommended by ACS

Wheat and Rice Bran as Natural Additives for the Protection of Fish Oil from Oxidation

Zhen Rohfritsch, Rachid Bel-Rhlid, *et al.*

JULY 28, 2021
ACS FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

READ 

Foodomics Revealed the Effects of Extract Methods on the Composition and Nutrition of Peanut Oil

Fan Jiang, Yong-Jiang Xu, *et al.*

JANUARY 09, 2020
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

READ 

Effect of Phospholipase A₁ and High-Pressure Homogenization on the Stability, Toxicity, and Permeability of Egg Yolk/Fish Oil Emulsions

Selene Yadira Gonzalez Toledo and Jianping Wu

JULY 27, 2020
JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY

READ 

Effects of Drying Methods on the Content, Structural Isomers, and Composition of Astaxanthin in Antarctic Krill

Xin-Yuan Cong, Kai-Liang Leng, *et al.*

OCTOBER 25, 2019
ACS OMEGA

READ 

Get More Suggestions >

11 Anhang

11.1 Supporting information *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (28), 7960–7968

SUPPORTING INFORMATION

Novel Amidine Protein Crosslink Formed by the Reaction of Glyoxal with Lysine

Author Names and Affiliations

Michael D. Eggen and Marcus A. Glomb

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

Corresponding Author

Prof. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle/Saale, Germany; Telephone +49-345-5525784,
Fax: +49-345-5527341; email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

SUPPORTING INFORMATION

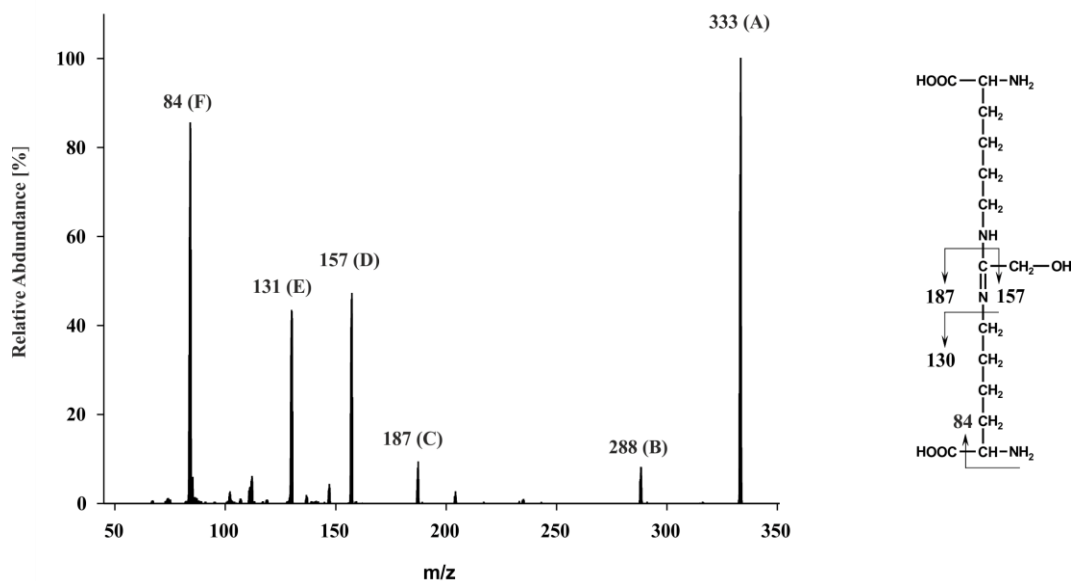


Figure SI-1 Verification of the fragmentation pattern of GLA by HR-MS

A) m/z 333.2125 (found), 333.2138 (calculated for $C_{14}H_{29}O_5N_4$ $[M]^+$); **B)** m/z 288.1918 (found), 288.1923 (calculated for $C_{13}H_{26}O_4N_3$ $[M]^+$); **C)** m/z 187.1076 (found), 187.1083 (calculated for $C_8H_{15}O_3N_2$ $[M]^+$); **D)** m/z 157.0971 (found), 157.0977 (calculated for $C_7H_{13}O_2N_2$ $[M]^+$); **E)** m/z 130.0860 (found), 130.0868 (calculated for $C_6H_{12}O_2N$ $[M]^+$); **F)** m/z 84.0806 (found), 84.0813 (calculated for $C_5H_{10}N$ $[M]^+$).

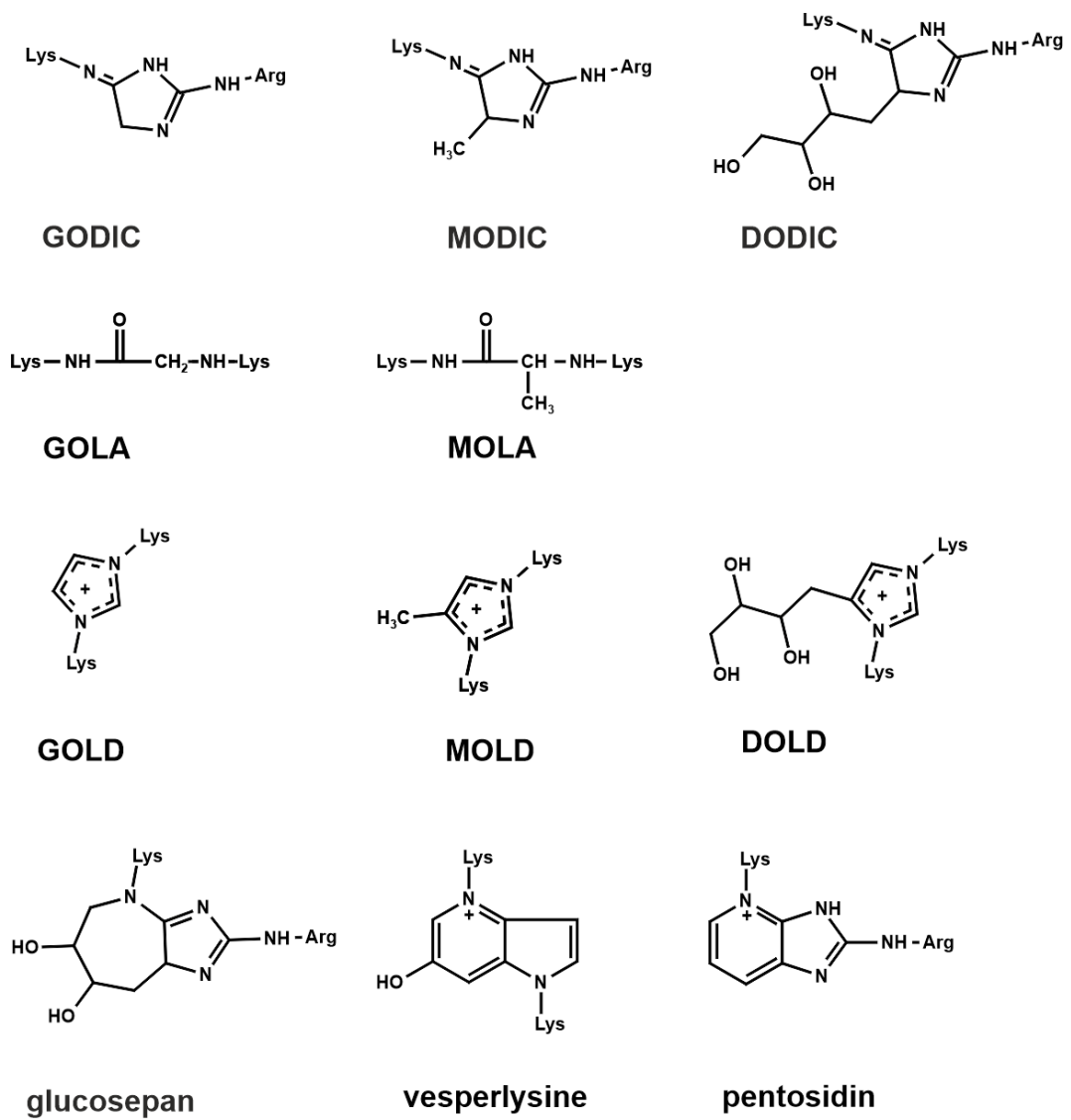


Figure SI-2. Structures of selected advanced glycation end products.

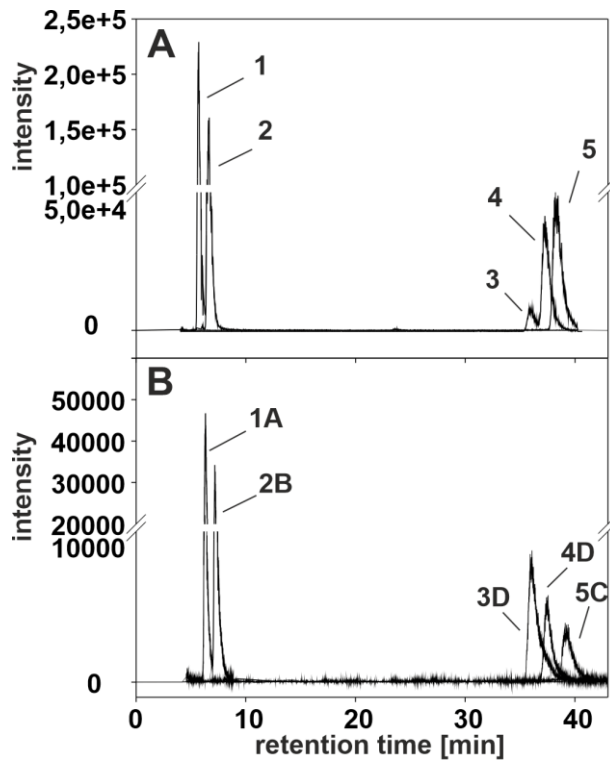


Figure SI-3. HPLC-Chromatogram of authentic reference standard A and constructed chromatogram of protein hydrolysates B.

Carboxymethyl lysine 1, *N*⁶-glycolyl lysine 2, gloxal lysine amide 3, gloxal lysine amidine 4, gloxal lysine dimer 5. Protein incubations were measured in four different dilutions, which are given in brackets. A acidic hydrolysis (0.0015 mg/mL), B enzymatic hydrolysis (0.0061 mg/mL), C acidic hydrolysis (0.0122 mg/mL), D enzymatic hydrolysis (0.4065 mg/mL).

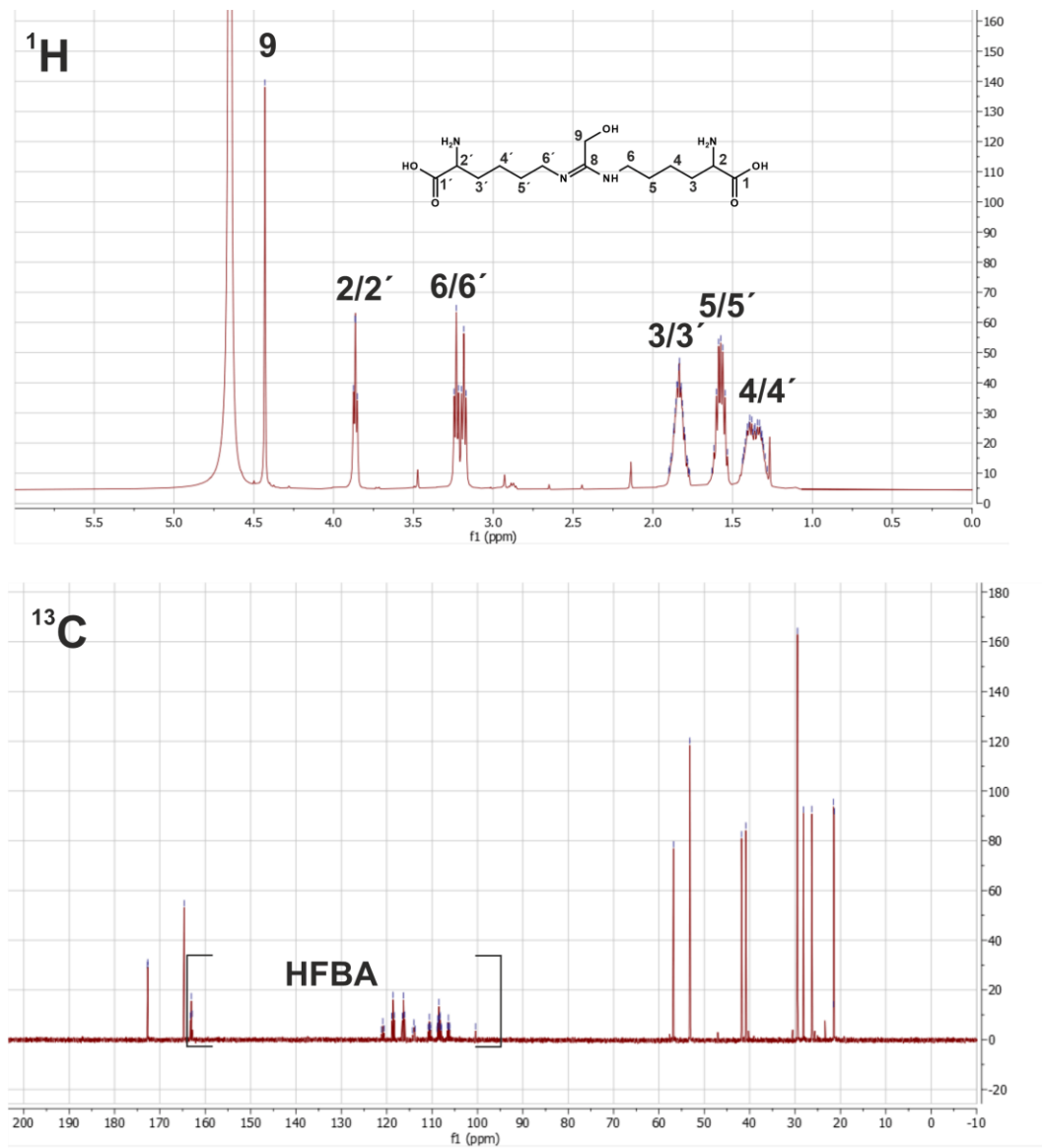


Figure SI-4. ¹H and ¹³C NMR spectra of GLA in D₂O.

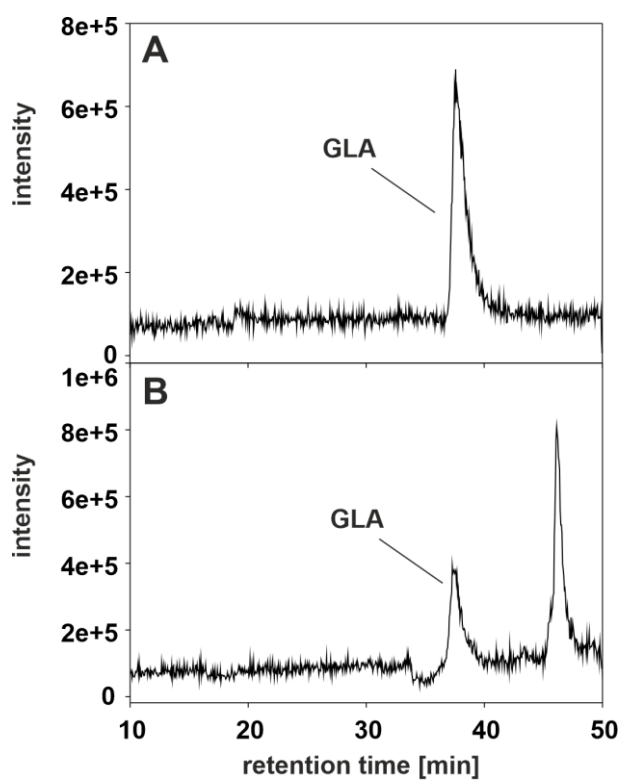


Figure SI-5. Total ion chromatogram of m/z 333.1. Authentic reference standard GLA A, enriched butter biscuit B.

The CID spectra of the GLA peak (36.8 min – 38.2 min) of authentic standard and enriched butter biscuit are shown in results and discussion section in figure 2.

11.2 Supporting information *J. Agric. Food Chem.* 2021, 69 (50), 15374–15383

Analysis of Glyoxal and Methylglyoxal derived Advanced Glycation End Products
during Grilling of Porcine Meat

Michael D. Eggen and Marcus A. Glomb*

SUPPORTING INFORMATION**Author Names and Affiliations**

Michael D. Eggen and Marcus A. Glomb

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

Corresponding Author

Prof. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle/Saale, Germany; Telephone +49-345-5525784,
Fax: +49-345-5527341; email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

SUPPORTING INFORMATION

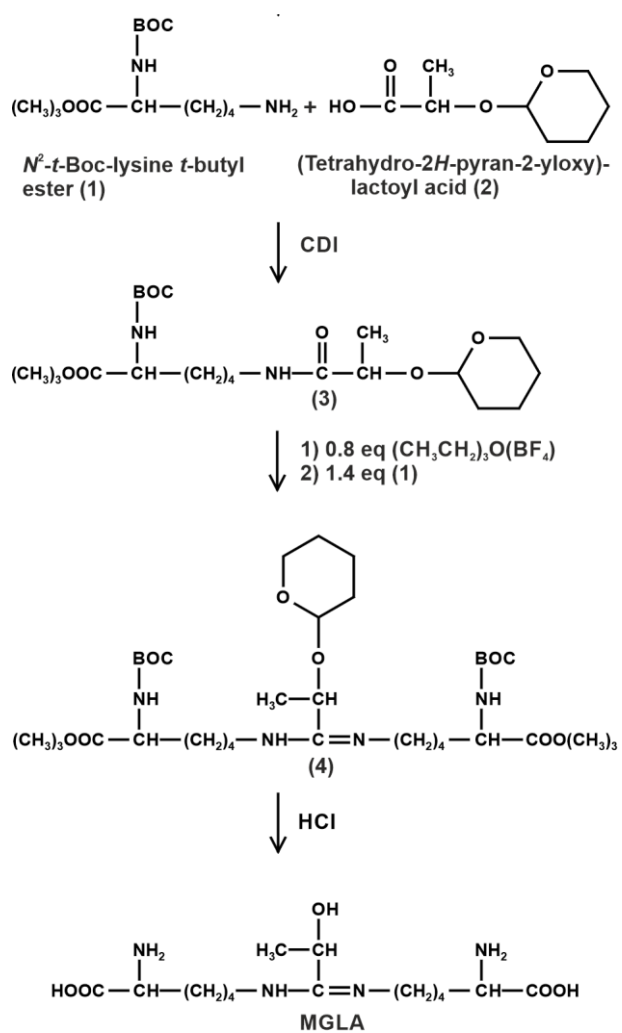


Figure SI-1: Synthesis of MGLA. CDI: 1,1'-carbonyl diimidazole

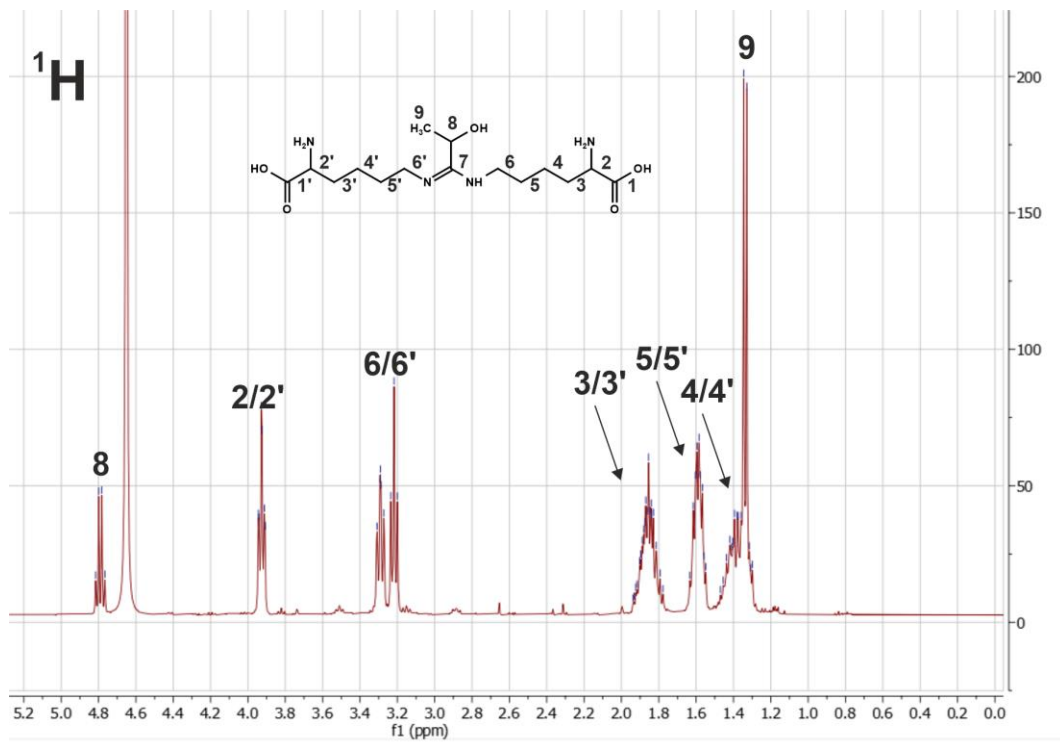


Figure SI-2: ^1H -NMR spectrum of MGLA in D_2O .

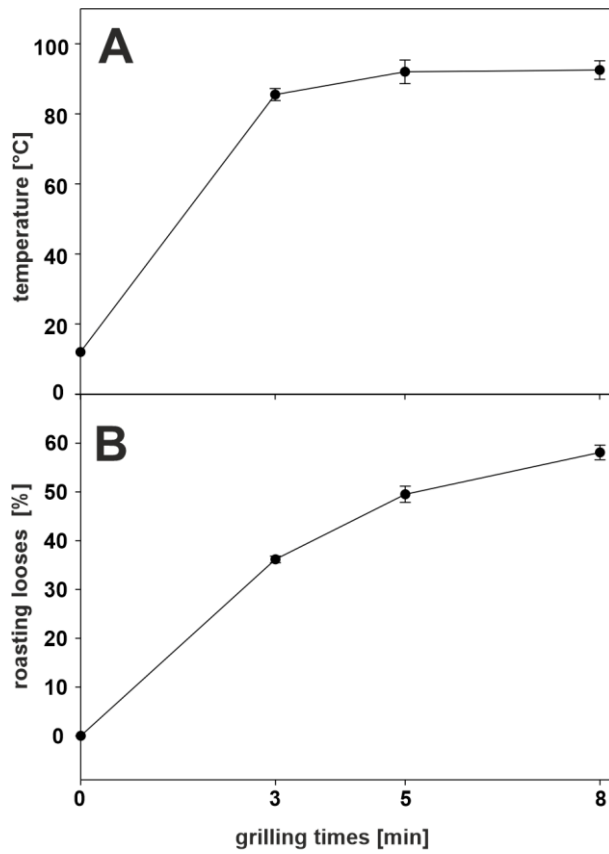


Figure SI-3: Changes of the internal temperature during the grilling of meat (A) and roasting losses (B).

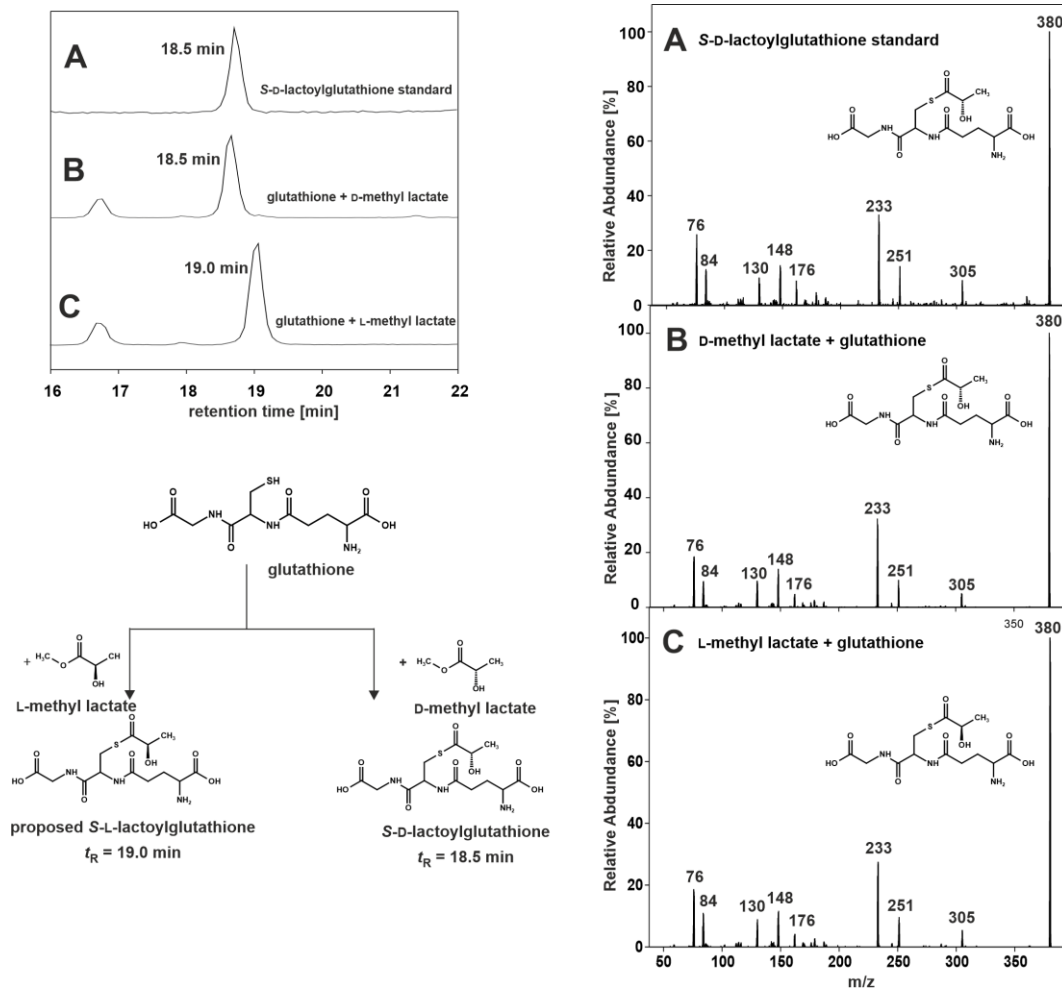


Figure SI-4: Synthesis of S-L-lactoylglutathione. 8 mM L-methyl lactate or 8 mM D-methyl lactate and 8 mM glutathione in 500 μ L H₂O were incubated at pH 6.0 (100 mM phosphate) at 50°C for 20h in an oil bath. Each incubation was done independently in triplicate. Samples were stored at -18°C and appropriately diluted with H₂O before subsection into HPLC-MS/MS.

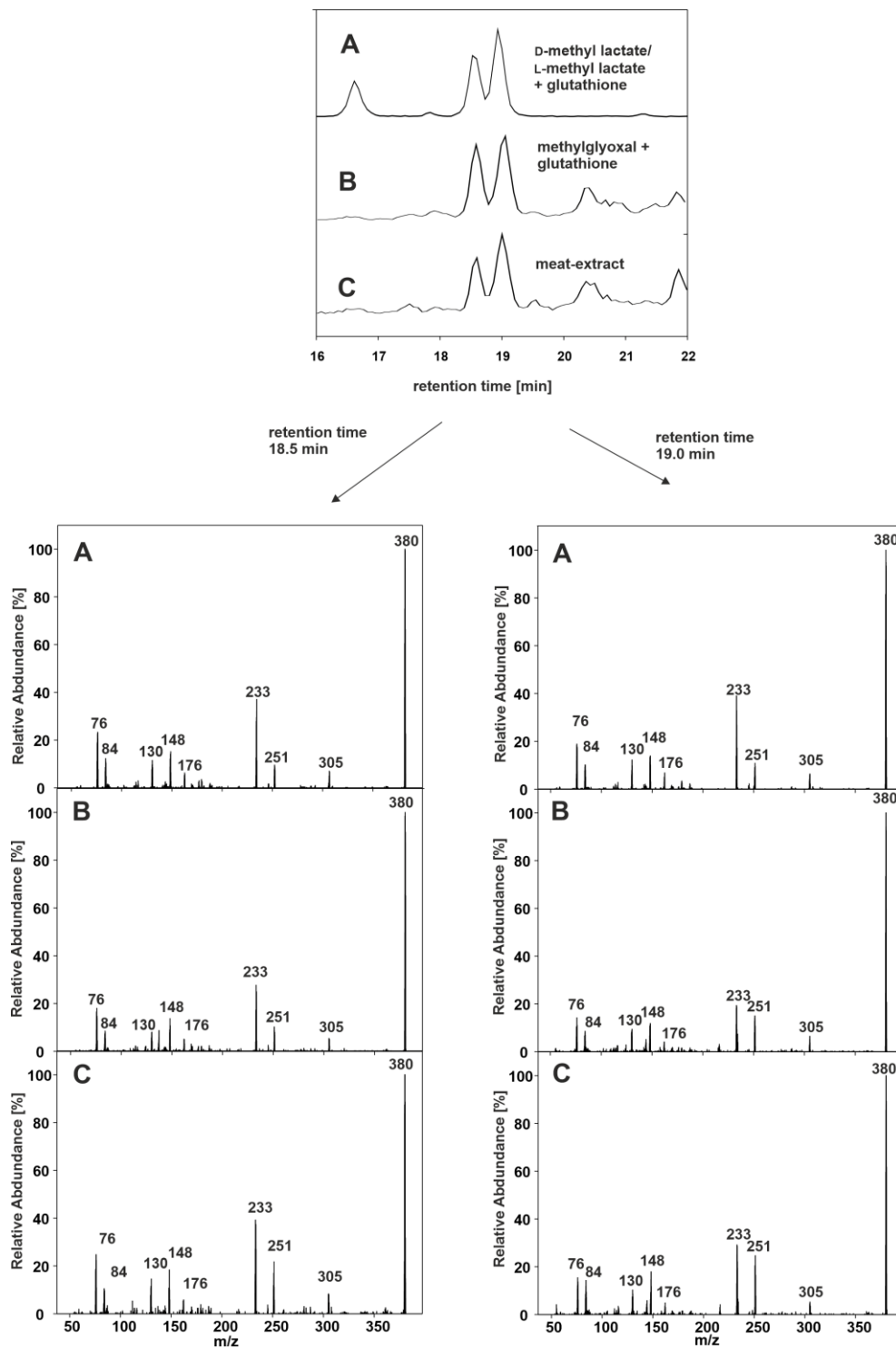


Figure SI-5: HPLC-MS/MS chromatogram of the mass trace of m/z 380 and collision induced dissociation (CID) spectra. Incubation products of D-methyl lactate and L-methyl lactate (A). Methylglyoxal incubation: 40 mM N^2 -*t*-Boc-lysine were incubated with 8 mM methylglyoxal and 8 mM glutathione in 500 μ L H_2O at pH 6.0 (100 mM phosphate) at 50°C for 20h in an oil bath. Samples were stored at -18°C and appropriately diluted with H_2O before injection into HPLC-MS/MS (B). Meat extract of 5 min grilled patty (C).

11.3 Supporting information *J. Agric. Food Chem.* 2022, 70 (33), 10271-10283**SUPPORTING INFORMATION**

Lipid Peroxidation has major impact on malondialdehyde-derived but only minor influence on glyoxal and methylglyoxal-derived protein modifications in carbohydrate-rich foods

Author Names and Affiliations

Michael D. Eggen, Paul Merboth, Helen Neukirchner, and Marcus A. Glomb

Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany

Corresponding Author

Prof. Marcus A. Glomb

Kurt-Mothes-Strasse 2, D-06120 Halle/Saale, Germany; Telephone +49-345-5525784,
Fax: +49-345-5527341; email: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de

SUPPORTING INFORMATION

Figure SI-1. HPLC-Chromatogram, authentic reference standard (A), exemplary chromatogram of malondialdehyde from a wafer workup after pre-column derivatization with 2-thiobarbituric acid with (B) fluorescence detection (ex 525 nm, em 560 nm) and (C) UV-detection at 532 nm.

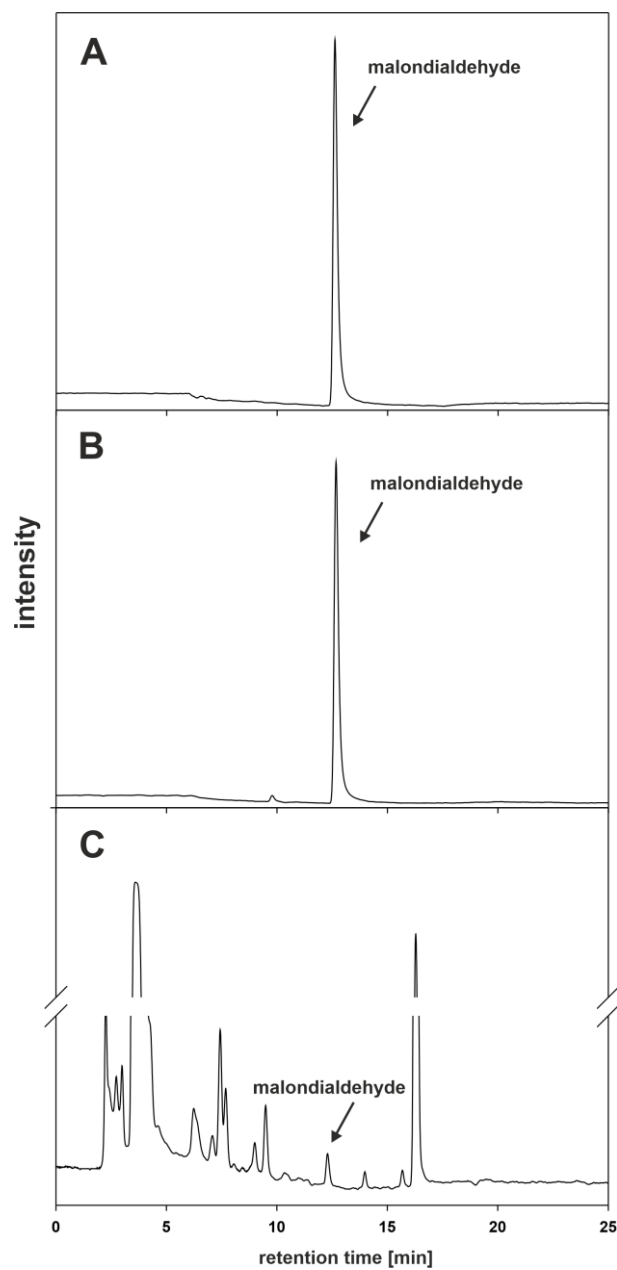
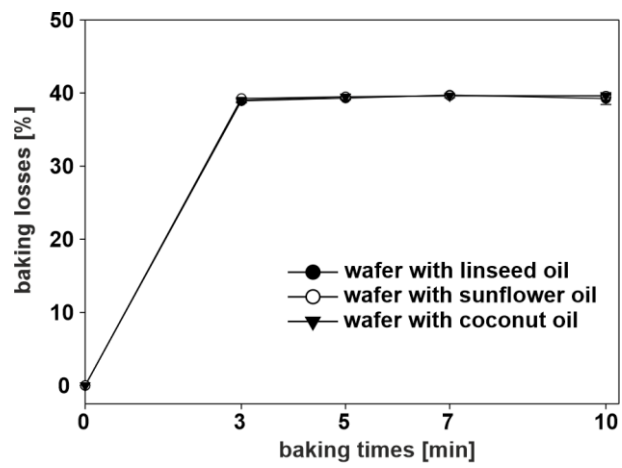


Figure SI-2. Weight losses during the baking of wafers.



Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Michael Dominik Eggen
Geburtsdatum	
Nationalität	Deutsch

Beruflicher Werdegang

Seit 06/2022	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, WACKER Biotech GmbH, Halle (Saale)
06/2018-05/2022	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie – Lebensmittelchemie, Arbeitskreis Prof. Dr. M. A. Glomb

Ausbildung

10/2013-04/2018	Studium der Lebensmittelchemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemiker mit dem Prädikat sehr gut (1,0)
06/2013	Abitur am Ohm-Gymnasium Erlangen

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Michael Eggen, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Michael Eggen

Halle (Saale), 21.04.2023