

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISION DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUIMICA

“DETERMINACIÓN DE GLIOXAL Y METILGLIOXAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

PRESENTA

Q. PAULA GABRIELA LÓPEZ VAZQUEZ

GUANAJUATO, GTO., 27 DE AGOSTO 2014

Miembros del Jurado asignados para el Examen que para obtener el grado de Doctor en Química presenta la Q. Paula Gabriela López Vázquez:

Dra. Leticia López Martínez
Presidente

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Sinodal

Dra Eunice Yañez Barrientos
Sinodal

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar
Sinodal-Suplente

INDICE

CONTENIDO

INDICE.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
I. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES.....	1
I.1. INTRODUCCIÓN	1
I.2 La reacción de Maillard	3
I.3 Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs).....	4
I.4 Formación endógena de compuestos dicarbonílicos.....	5
I.5 Fuentes exógenos de formación de compuestos dicarbonílicos.	9
I.6 La miel como fuente dietética de compuestos α -dicarbonílicos.	12
I.7 Otras fuentes de exposición del hombre a compuestos α -dicarbonílicos.	13
I.8 Determinación de compuestos dicarbonílicos	14
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. OBJETIVO	24
IV.PARTE EXPERIMENTAL	25
IV.1. Reactivos, Disolventes.....	25
IV.2 Instrumentación analítica	25
IV. 3 Muestras analizadas.....	25
IV.3.1 Muestras de mieles:	25
IV.3.2 Muestras de orina:	26
IV. 4 Programas de software	26
IV.5. Reacciones de derivatización	26
IV.5.1. Derivatización con 1,2-Diaminopropano	26
IV.5.2 Derivatización con 4-metoxi-o-fenilendiamina	27
IV.6 Determinación de G, MG, DMG en mieles por cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID)	27
IV.6.1. Soluciones de calibración y tratamiento de muestras.....	27
IV.6. 2 Análisis por cromatografía de gases con detector por ionización en flama (GC-FID).....	28
IV.6 Análisis de muestras biológicas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-TQMS(TQ)).....	29

IV.6.2. Desarrollo de las condiciones de análisis de masas.....	29
IV.6.3 Proceso de calibración	30
IV.6.4. Tratamiento de muestras.....	30
IV.6. 1 Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-MS(TQ)).....	30
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
V.1 Desarrollo de la metodología de detección de Glioxal, Metilglioxal y Dimetilglioxal por Cromatografía de gases con detector de ionización por flama (GC-FID).....	33
V.1.1 Selección del Reactivo Derivatizante (RD).	33
V.1.2 Selección del estándar interno (EI)	37
V.1.3 Preparación de la curva de calibración para GC-FID.....	39
V.1.4 Cuantificación de G, MG y DMG en mieles y jarabes.....	41
V.2 Desarrollo del procedimiento de determinación de glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS(TQ)).....	43
V.2.1 Análisis de glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal y fenilglioxal por GC-MS(TQ) en modo de barrido completo (FULL SCAN)	44
V.2.2 Adquisición de cromatogramas GC-MS en el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) para glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal y fenilglioxal.....	48
V.2.3 Selección de condiciones para la adquisición de datos en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples.....	49
V.2.4 Proceso de calibración en el procedimiento GC-MS(TQ) en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples.....	54
V.2.5 Análisis de muestras biológicas en GC-MS(TQ) en modo MRM	56
VI. CONCLUSIONES	58
VII. REFERENCIAS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
°C	Grado centígrado
3-DG	3-Deoxiglucosona
4MPD	4 –metoxi-o-fenilendiamina
AD	Detección amperométrica
AGEs	Productos finales de glicación avanzada
ALEs	Productos finales de lipo-oxidacion avanzada
Autor et. All	Autor y compañía
CE	Electroforesis capilar
CEL	N-carboxi-etil-lisine
CID	Ionización inducida por colisiones
CML	N-carboxi-metil-lisine
DAN	2,3,diaminonaftaleno
DAP	Diaminopropano
DCDB	4,5-dicloro-1,2-diaminobenceno
DCn	Pacientes diabéticos sin complicaciones
DDB	2,3-Diamono-2,3-dimetilbutano
DDB2	1,2-diamino-4,5-dimetilenedioxibenceno;
DDP	Sulfato de 5,6-diamino-2,4-hidroxi pirimidina;
DEG	Dietilglioxal
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMB	1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno
DMG	Dimetilglioxal, 1,3-Butanodiona
DMPD	4,5-dimetil-1,2-fenilendiamina
DNPH	2.4-dinitrophenylhidrazine
DSn	Pacientes diabéticos con complicaciones
EC	Energía de colisión
EI	Estándar interno
FG	Fenilglioxal
G	Glioxal
GC-FID	Cromatografía de gases con detección por ionización en llama
GC-MS	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas
GC-MS(TQ)	Cromatografía de gases con detector de masas de triple cuadrupolo
GC-MS(TQ)	Cromatografía de gases masas de triple cuadrupolo
GSH	Glutaciona
HDL	Lipoproteínas de alta densidad

HPLC- FLD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector fluorométrica
HPLC-DAD	Cromatografía líquida de alta resolución con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos
IE	Ionización por impacto de electrones
in situ-LD	Desorción líquida in situ
LD	Límite de detección
MG	Metilglioxal
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
NOx	Óxidos de Nitrógeno
OPA	o-ftalaldehido
OPD	1,2-diaminobenceno
PFBHA	o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-hidroxilamina
PFBOA	o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroxylamine
Pn	Pacientes sanos
PPC	Control neumático programable
RD	Reactivo derivatizante
S/N	Relación señal-ruido
SBSE	Extracción por sorción con marra magnética
SIM	Monitoreo de ion selectivo
SUB	Universidad Shangai deShangai UniversBaoshanity of Baoshan
TBA	Ácido 2-tiobarbiturico
TIC	Conteo total de iones
TR	Tiempo de retención
TRI	6-hidroxi-2,4,5-triaminipirimidina;
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
α -DC	α -dicarbonilos

I. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

I.1. INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus es una enfermedad crónico-degenerativa que se presenta cuando el organismo no produce suficiente insulina o, esta no actúa debidamente, provocando deficiencias en el proceso de asimilación y metabolismo de la glucosa. Las concentraciones anormalmente altas de glucosa en sangre (hiperglicemia) son responsables por varios procesos que pueden conducir al desarrollo de enfermedades cardiovasculares [1-4], nefropatía [5-10], retinopatía [9, 11, 12], neuropatía [13, 14], etc. Existen numerosas clasificaciones de la diabetes, siendo la más aceptada la formulada por el Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus emitida en 1997, que la divide en dos tipos principales sin considerar la edad de inicio: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La diabetes DM1 es caracterizada por una destrucción auto inmune de células pancreáticas tipo beta que típicamente lleva a déficit absoluto de insulina. Ocurre principalmente en niños o adultos jóvenes, pero puede presentarse a cualquier edad. Este tipo de diabetes representa entre el 5 y 10 % de personas enfermas. La DM2 se caracteriza por resistencia insulínica, acompañada por un déficit relativo de insulina y representa el 90-95 % de los casos de diabetes mellitus. Los mecanismos responsables de las complicaciones en diabetes no se conocen con exactitud, sin embargo, existe un consenso acerca de la importante contribución de una serie de parámetros que se mencionan a continuación [9, 15-18]: (1) Acelerada glucosilación no enzimática con depósitos de productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs), (2) aumento de estrés oxidativo, (3) activación de isoformas de proteína quinasa C y (4) activación de la vía de la aldosa reductasa.

Se han definido los siguientes factores de riesgo en diabetes: edad mayor de 45 años, obesidad, antecedentes familiares de la enfermedad, bajos niveles séricos de *HDL (High density lipoprotein)*, altos niveles de triglicéridos, alta presión sanguínea, intolerancia a glucosa, síndrome metabólico y falta de actividad física. Además, ciertos grupos étnicos, incluyendo a los hispano-americanos presentan un mayor riesgo de desarrollar DM2. En México, la diabetes está afectando a 8% de la población y se sabe que es la cuarta causa más importante de mortalidad en nuestro país, así como la primera causa de estados terminales de insuficiencia renal, ceguera adquirida y de las amputaciones no relacionadas con accidentes.

No cabe duda que el diagnóstico y el control integral de los pacientes diabéticos son de suma importancia, ya que permiten definir y afinar el tratamiento, permiten también recomendar tanto dieta como ejercicios adecuados ayudando de esta manera a mantener un buen nivel de la glucosa en el organismo y así evitar o retardar el avance de las complicaciones propias de la enfermedad. En este sentido, existen varios marcadores utilizados en la práctica común de seguimiento de los pacientes, tales como el nivel sérico de glucosa, prueba de tolerancia a glucosa, actividad de insulina, nivel de colesterol y triglicéridos, así como nivel sérico de hemoglobinas glucosiladas [19, 20]. Es importante resaltar que dichas pruebas carecen de especificidad. Por ejemplo, el nivel sérico de glucosa solamente refleja la ingesta reciente, los niveles de colesterol y de triglicéridos pueden ser elevados en las personas no diabéticas, etc. Para caracterizar mejor el estado de paciente diabético se utiliza un conjunto de los ensayos y, además se siguen buscando los marcadores de la enfermedad de mayor selectividad, mismos que podrían ser empleados en la evaluación rutinaria clínica.

En la última década se ha reconocido la importancia de productos finales de glicación avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés Advanced Glycosylation End Products), como indicadores del progreso de la diabetes.

Los AGEs se refieren a un grupo de compuestos que se forman mediante las reacciones no enzimáticas entre azúcares reductores y biomoléculas tales como aminoácidos, ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. Los productos intermedios de estas reacciones se conocen como compuestos de Amadori, mismos que a través de una serie de reacciones y eventos englobados por el nombre de la "Reacción de Maillard" son transformados de manera irreversible en los productos de glicación avanzada (AGEs). La formación de los AGEs, es un proceso natural que ocurre inevitablemente en el organismo humano; sin embargo su anormal aceleración es considerada como un factor clave en el desarrollo y el progreso de la diabetes mellitus y otras enfermedades crónico-degenerativas [21].

Los compuestos dicarbonílicos de baja masa molecular aparecen como productos de oxidación de azúcares e intermediarios de los AGEs; estos compuestos son altamente reactivos y tóxicos, ya que pueden interactuar fuertemente con las proteínas y los ácidos nucleicos, induciendo mutaciones y apoptosis celular.

En la actualidad varios compuestos dicarbonílicos han sido estudiados por su posible intervención en procesos de inflamación, en patogénesis de enfermedades crónicas y en los procesos de envejecimiento [22, 23]. Se considera que estos compuestos se acumulan en los fluidos y tejidos durante el aumento del estrés oxidativo y carbonílico; de tal manera que pueden participar en la

modificación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos formando aductos tales como los productos finales de glicación avanzada (AGEs) o lipooxidación avanzada (ALEs). [24-26]. Algunos ejemplos de de estos son glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal entre otros.

El presente proyecto de tesis se enfoca en el desarrollo e implementación de los procedimientos analíticos que permitan la cuantificación de glioxal (G), metilglioxal (MG) y dimetilglioxal (DMG) llamado también diacetil, en muestras biológicas y en alimentos.

1.2 La reacción de Maillard

La reacción de Maillard fue descrita por primera vez por el científico francés Louis Camille Maillard en 1912. Descubrió como los aminoácidos en proteínas se unían a azúcares mientras se cocinaban u horneaban alimentos que contenían estos compuestos, el resultado visible fue que la comida se tornara en un tono oro-café, proceso parecido a la caramelización [27]. Con el paso de tiempo, se descubrió que el mismo proceso ocurre *in vivo* y se formuló la hipótesis que la formación acelerada de los productos avanzados de glicación (AGEs) tiene implicaciones en diferentes tipos de enfermedades, incluyendo la diabetes. En particular, la formación de los AGEs impide la destrucción y eliminación urinaria de los aminoácidos[27].

La reacción de Maillard en general envuelve la condensación del grupo carbonilo de algún azúcar reductor con un grupo amino libre, comúnmente residuos de lisina. Esta reacción forma productos inestables del tipo base de Schiff (aldimina) que sufren un re-arreglo estructural hasta los llamados "Productos de Amadori"; después estos productos se descomponen por diferentes procesos de oxidación para formar estructuras más estables, los AGEs [28, 29].

En la Figura 1.1 se muestra la reacción de Maillard a partir de la glucosa, el cual es el azúcar reductor más comúnmente encontrado y el precursor carbonílico mas estudiado en condiciones fisiológicas [28].

La glicación o glucosilación no enzimática es un proceso que contribuye a la modificación post trasduccional de proteínas [30] en presencia de un azúcar reductor, es lento bajo condiciones fisiológicas, dando lugar a la presencia de aductos derivados de lisina y arginina en proteínas celulares y extracelulares. La glicación de proteínas ha sido vinculada con mecanismo de enfermedades, particularmente el desarrollo de complicaciones clínicas crónicas asociadas con diabetes mellitus, retinopatía y neuropatía [31, 32] enfermedades macro-vasculares [33, 34] y envejecimiento[35].

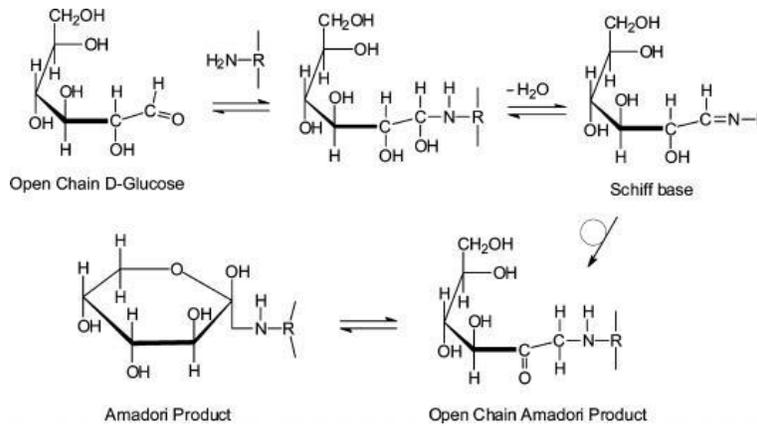


Figura I.1. Esquema general de la Reacción de Maillard

I.3 Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs)

La AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas que se acumulan en el plasma y otros fluidos biológicos además en células y tejidos, su formación acelerada es considerada como el principal agente patológico causando envejecimiento, diabetes, arterosclerosis, falla renal y otras enfermedades crónicas [36]. Ejemplo de esto son los pacientes con diabetes cuyas concentraciones de AGEs son altas debido a que su formación está relacionado directamente con la concentración de glucosa [37].

Por otra parte, existen evidencias de que los niveles de AGEs en personas fumadoras es significativamente más alta comparada con aquellos que no fuman [38], lo que confirma que no solamente los AGEs endógenos (y sus precursores), pero también los inhalados o ingeridos tienen relevancia.

La ingesta de AGEs es de gran importancia debido a que muchos procesos de producción vía térmica de alimentos propician su formación representando un gran riesgo a la salud.

Ejemplos de AGEs son N-carboximetil-lisina (CML), N-carboxietil-lisina (CEL) entre otros. La Figura I.2 muestra ejemplos de estos compuestos, que como ya se mencionó son productos de la reacción de Maillard.

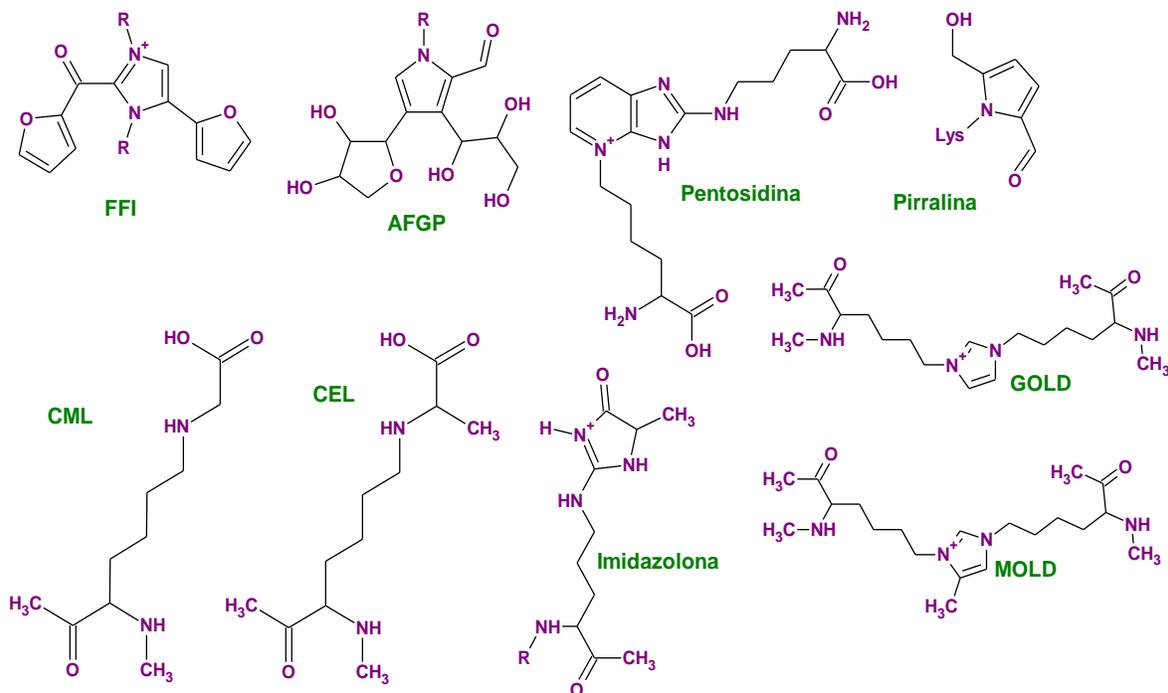


Figura I.2. Estructuras químicas de algunos productos de glicación avanzada (AGEs) FFI: 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1H-imidazol; AFGP: 1-alkil-2-folmil-3,4-diglicosil pirrol; Pentosidina, Pirralina; CML: N-e-carboximetil-lisina, CEL: N-e-carboxietil-lisina; imidazolona; GOLD: dimero de Glioxal-lisina; MOLD: dimero de metil-glioxal-lisina [21].

Estos AGEs se pueden subdividir en las diferentes categorías:

- *AGEs fluorescentes* que provocan entrecruzamiento de cadenas polipeptídicas como pentosidina y productos de entrecruzamiento .
- *AGEs no fluorescentes* que provocan entrecruzamiento de cadenas polipeptídicas como GOLD, MOLD, etc.
- *AGEs que no provocan el entrecruzamiento* entre cadenas polipeptídicas como pirralina, CML.

I.4 Formación endógena de compuestos dicarbonílicos

El estudio de las rutas de formación y acumulación de los AGEs es importante para entender su papel en los procesos de envejecimiento y en el desarrollo/progreso de las enfermedades crónico-degenerativas. En este sentido, existe interés en la determinación de compuestos dicarbonílicos pequeños. Estos compuestos dicarbonílicos actúan como precursores de los AGEs y también se

forman durante las reacciones Maillard, por lo que su análisis en matrices biológicas (orina, alimentos) es el tema del presente trabajo.

El proceso de formación de compuestos dicarbonílicos está vinculado directamente con la presencia de niveles altos de glucosa, en la Figura I.3 se esquematiza la reacción de Maillard donde se puede observar que en cualquiera de los pasos de la reacción tanto la glucosa como los intermediarios, es decir, las Bases de Schiff y los productos de Amadori pueden sufrir oxidación y dar como resultado la formación de compuestos dicarbonílicos pequeños como Glioxal y Metilglioxal y que estos a su vez son precursores importantes para la formación de AGEs.

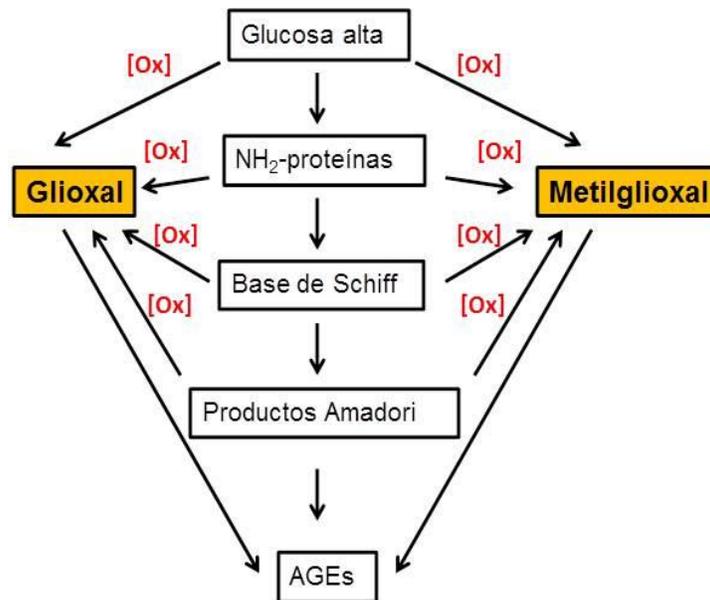


Figura I.3. Rutas de formación de Glioxal y Metilglioxal vía Reacción de Maillard

Sin embargo, el proceso de formación de estos compuestos carbonílicos no solamente se lleva a cabo mediante la glicación de proteínas, en la Figura I.4 se puede observar que G y MG pueden aparecer como productos de fragmentación de trifosfato, catabolismo de cuerpos cetónicos, vía peroxidación lipídica entre otros. Es por ello que los compuestos dicarbonílicos se engloban bajo el nombre de α -oxoaldehidos o compuestos α -dicarbonílicos (α -DC). Los compuestos más importantes de este grupo son glioxal, metilglioxal y 3-deoxoglucosona. Cabe resaltar que estos compuestos son considerados altamente tóxicos debido a su alta reactividad .[21, 39]..

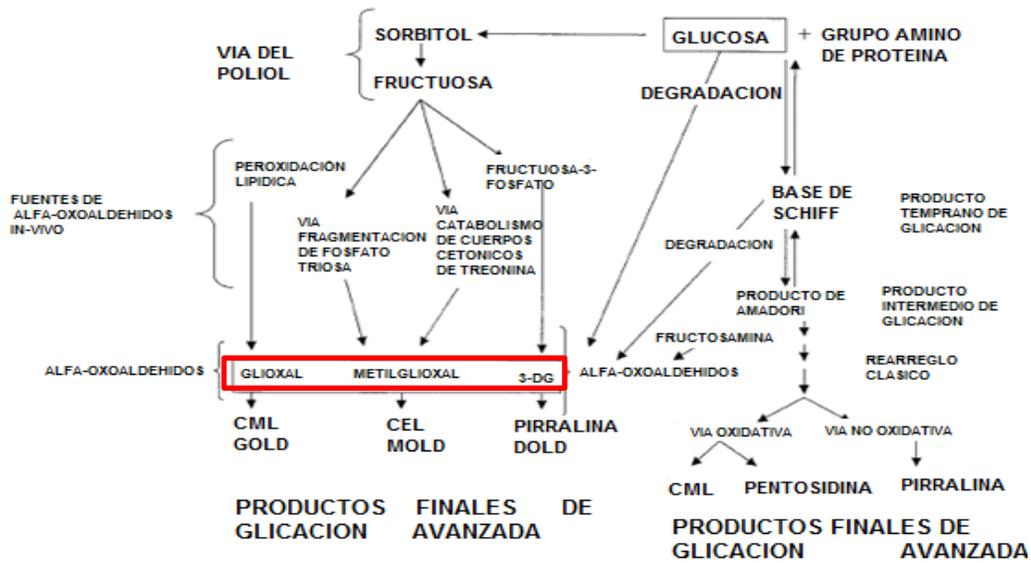


Figura I.4. Formación de α -oxoaldehídos como precursores de AGEs

En la Figura I.5 se muestran además del G y del MG otros compuestos dicarbonílicos precursores de AGEs. [21]

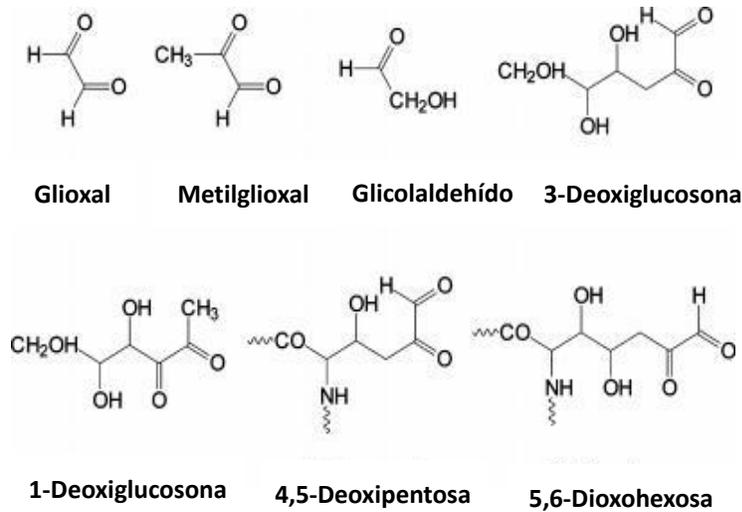


Figura I.5. Productos precursores de AGEs

G y MG son estructuralmente similares[40]; sin embargo glicoxal es formado principalmente durante la peroxidación de lípidos [41] o mediante la degradación oxidativa de glucosa [42] [43] mientras metilglicoxal es formado por fragmentación enzimática de fosfato de dehidroxiacetona y 3-

fosfato gliceraldehído , el metabolismo de acetona [44] y el catabolismo de treonina [45], además de formarse también por estrés oxidativo.

Existen evidencias que el metilglioxal y glioxal presentan la toxicidad directa a nivel celular [46, 47]. En particular, se ha reportado que el metilglioxal puede inhibir síntesis de las proteínas, modificar las funciones biológicas de proteínas o ácidos nucleicos y que es un agente mutagénico [48, 49]. En estudios llevados a cabo en diferentes grupos de pacientes diabéticos se han observado elevados niveles de concentración de estos dos compuestos indicando su posible relevancia en el desarrollo de típicas complicaciones de la enfermedad [46, 50-53]. Por otra parte, ambos compuestos han sido aceptados como importantes marcadores del estrés oxidativo [47, 54], por lo que existe el interés en su cuantificación confiable en fluidos biológicos y en tejidos. Cabe resaltar que los compuestos dicarbonílicos se presentan in vivo en bajas concentraciones debido a su alta afinidad a biomoléculas (proteínas) [55].

Dentro de las células, el impacto de la glicación es contrarrestado por cambios rápidos y la baja vida media de muchas proteínas celulares. Sin embargo algunas proteínas extracelulares, cuya vida media es larga, acumulan aductos de glicación con la edad [56]. El medio de defensa contra esto se lleva a cabo a partir de la detoxificación de compuestos dicarbonílicos, en la Figura 6 se esquematiza como se elimina G por la acción de glioxalasa, esto puede ocurrir con otros compuestos dicarbonílicos.

Los compuestos dicarbonílicos son detoxificados primeramente por acción de glioxalasa, en donde G forma un hemiacetal con glutatión (GSH), este es convertido a S-D-lactoilglutacion catalizada por glioxalasa. Se ha sugerido que G es convertido a glicolato catalizado también por glioxalasa, GSH es utilizado como un agente reductor primario en la célula; por lo tanto se requiere de la presencia de equivalentes reductores para tener defensa antioxidante y una detoxificación de carbonilos activa [40]. En la Figura 1.6 se describe el proceso ya descrito, donde se observan la formación natural de G y su posterior detoxificación.

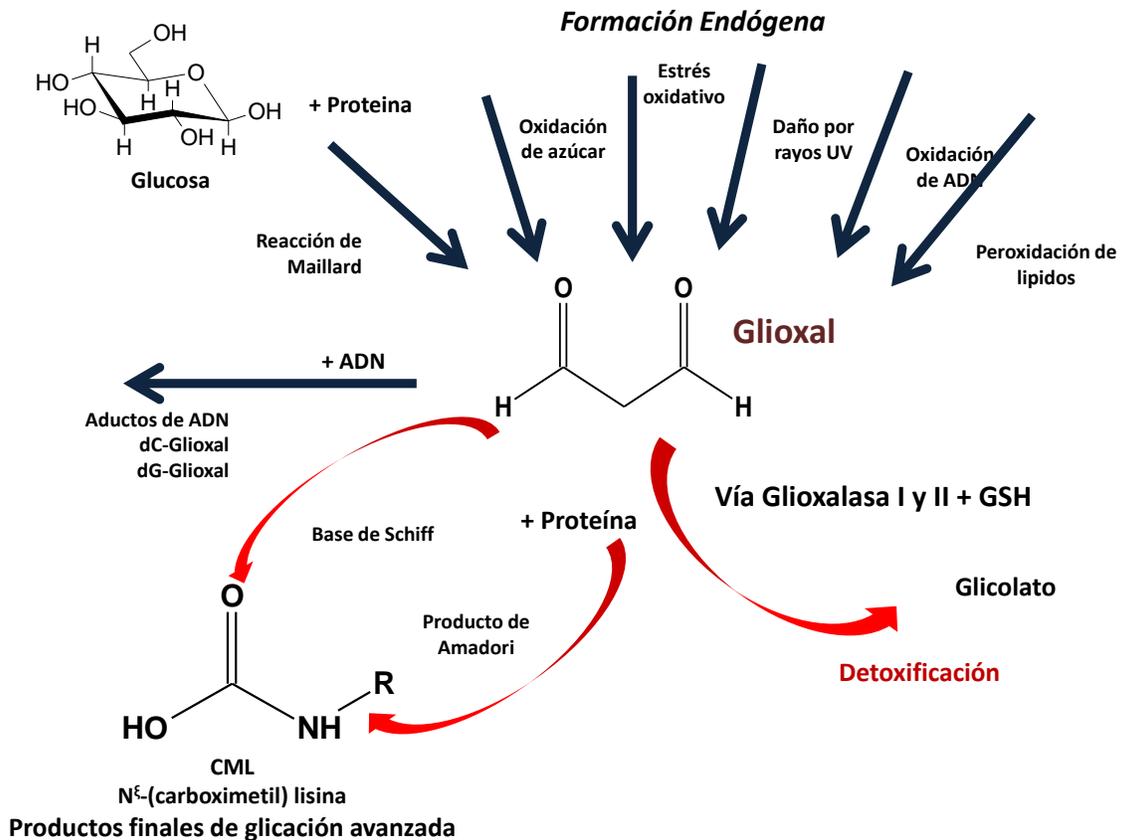


Figura I.6. Detoxificación de Glioxal por acción de Glioxalosas

Aunque la célula tiene su medio de defensa, existen diversos factores externos que propician el aumento de compuestos carbonílicos en el cuerpo, hecho que impide a la célula detoxificar todos estos. Además de la alta producción a nivel celular de estos, también están aquellos que se consumen de fuentes externas, como los alimentos.

1.5 Fuentes exógenas de formación de compuestos dicarbonílicos.

En la industria alimenticia existen varios procesos para la preparación y almacenamiento de comida empaquetada y/o enlatada, adicionando compuestos que brindan sabor, color y conservadores.

Los procesos térmicos son una parte importante de la preparación de comida que pueda incrementar su sabor agradable y alargar su vida en estante [29]. La comida enlatada por ejemplo

contiene grandes cantidades de proteínas y carbohidratos con los cuales se puede llevar a cabo la reacción de Maillard durante el proceso térmico, y continua durante su almacenamiento.

Además, una gran diversidad de productos es procesada dependiendo de las características que requiera el alimento. En el caso del sabor se busca la formación de α -aminocarbonilos, mientras que para el color se requiere de la formación de compuestos 2-carbonil-aminoácidos [57]. La Figura I.7 presenta gráficamente los procesos que se llevan a cabo para la obtención de compuestos que brindan tanto color y/o aroma.

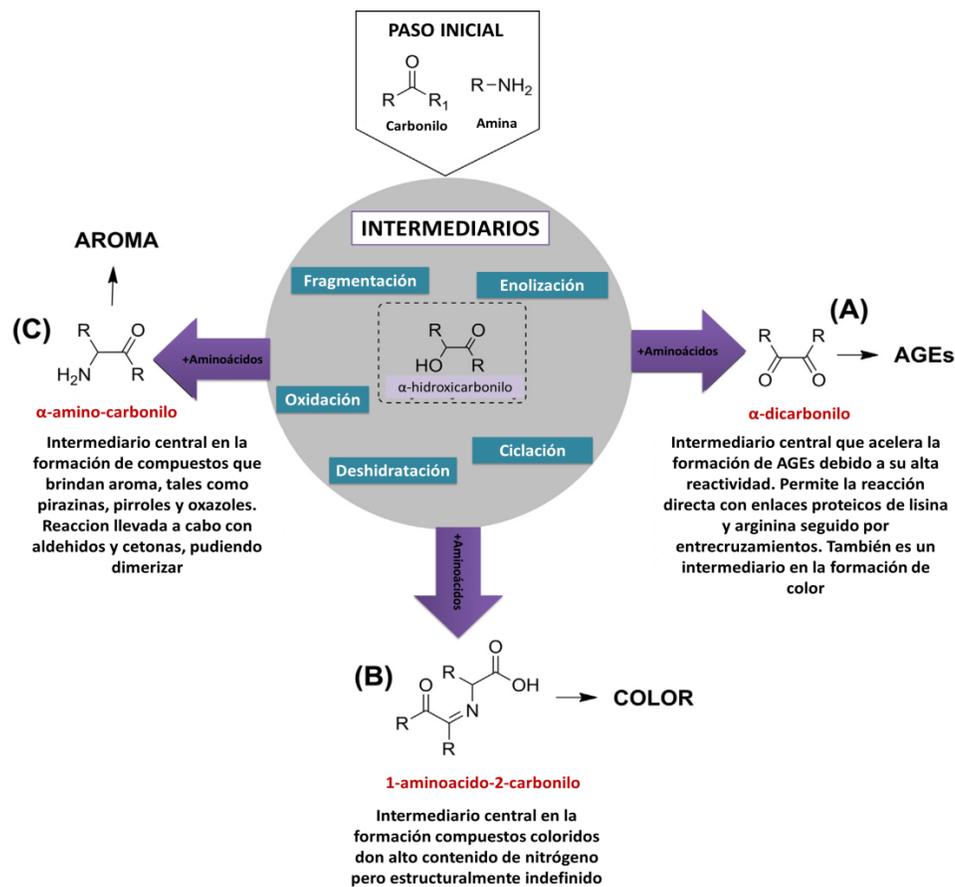


Figura I.7. Esquema general de la reacción de Maillard mostrando el paso inicial de reacción entre los grupos carbonilo y amino así como los intermediarios clave para el aroma y el color de los alimentos y la formación de los AGEs en alimentos durante su elaboración [57].

En la misma reacción se lleva a cabo la formación de compuestos α -dicarbonílicos (α -DC) como glicoxal y metilglicoxal y su posible conversión a AGEs dentro del mismo proceso. Esto hace que cantidades variables de glicoxal y metilglicoxal pueden ser ingeridos con los alimentos. En este sentido,

el MG ha sido reportado como componente de diferentes tipos de bebidas, como la cerveza adicionado como agente saborizante [58].

Además de estos compuestos se ha planteado el estudio de Dimetilglioxal (DMG) también conocido como Diacetil o 2,3-butanodiona por su presencia en diferentes fuentes alimenticias.

DMG es un líquido amarillo que es mezclado con otros ingredientes para producir el sabor de la mantequilla y otros sabores en una gran variedad de productos de consumo como palomitas de maíz [59]. También se encuentra de manera natural en la mantequilla, leche, queso, fruta, vino, cerveza, café y es producto natural de la fermentación microbiana [60, 61]. La importancia del estudio de este compuesto dicarbonílico radica en la afirmación de su carácter mutagénico mediante estudios del tejido cerebral de ratones [59].

Aunque el efecto de los α -DC exógenos no es muy conocido, en un estudio donde se hizo una simulación de la digestión gastrointestinal, se pusieron en contacto enzimas, pepsina y pancreatina con α -DC, y se observó que al final del proceso digestivo la concentración de G, MG y DMG fue disminuida, esto se le atribuyó a la producción de proteínas carboniladas por la reacción de los α -DC con la pepsina y la pancreatina [62].

Como ya se ha mencionado, estos compuestos no solo se pueden encontrar en los aditivos de color y aroma de los alimentos, sino también en aquellos cuya concentración de glucosa es alta, en la Figura I.8 se muestra un esquema de la degradación de glucosa durante el proceso térmico y de vida de estante.

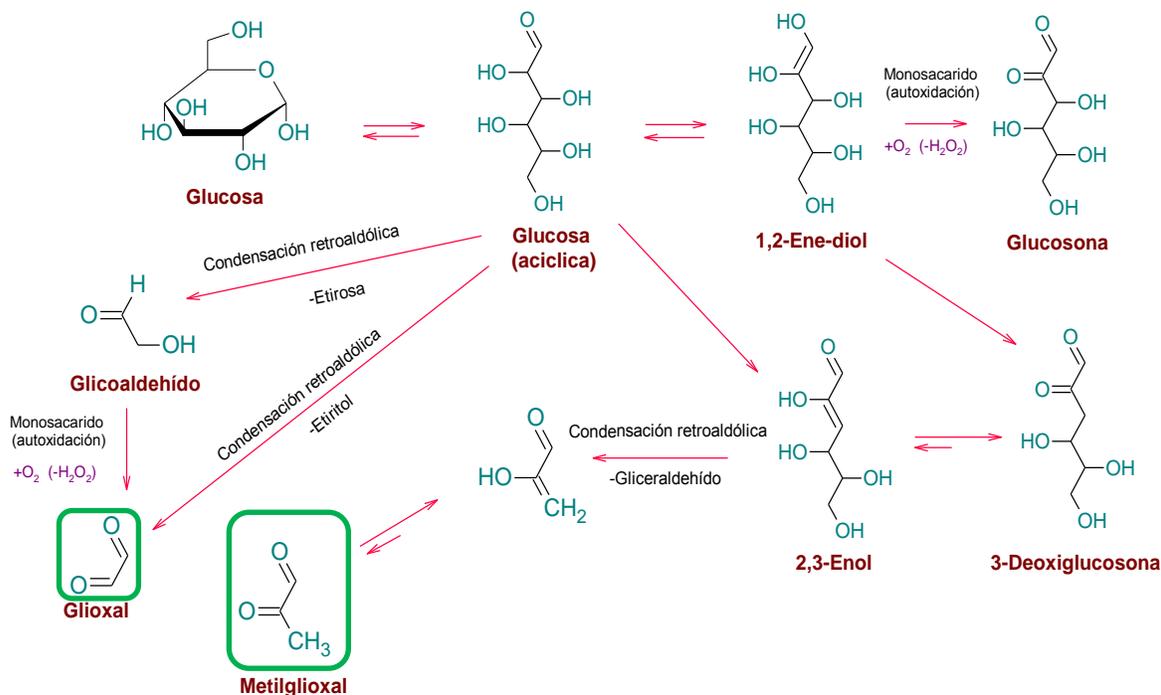


Figura I.8. Esquema de la formación de compuestos dicarbonílicos G, MG a partir de la degradación de glucosa, en alimentos con alto contenido de glucosa en vida de estante.

I.6 La miel como fuente dietética de compuestos α -dicarbonílicos.

Los α -dicarbonílicos han sido investigados en muestras de miel como indicadores de procesos térmicos durante su manufactura y almacenamiento [63].

La presencia de compuestos 1,2-dicarbonílicos tales como 3-deoxiglucosona (3-DG), glioxal (GO) y metilglioxal (MGO) en miel fue descrito por primera vez en 2004 por Weigel et al. (REFERENCIA), como una consecuencia de la degradación o caramelización. En la amplia gama de diferentes tipos de miel, el 3-DG, el cual es precursor del 5-hidroximetilfurfural (HMF), puede ser determinado en altas cantidades, entre 80 y 1270 mg/kg lo que ha sido asociado con el calentamiento y el almacenamiento. El contenido de Gy MG generalmente es bajo (poco más de 5 mg/kg). Sin embargo grandes cantidades de MGO (arriba de 760 mg/kg) son encontrados en la miel de Manuka[64]. Además está documentado que MG es un agente antibacterial estudiado principalmente en miel, específicamente miel de Manuka [65].

La miel de Manuka es producida por las abejas europeas *Apis mellifera* que se alimentan de la flor del árbol de Manuka (*Leptospermum scoparium*) proveniente de Nueva Zelanda (Figura I.9). Esta miel es reconocida por su fuerte actividad antimicrobiana [66] en un amplio rango de microorganismos

incluyendo cepas multiresistentes [64]; esta actividad no se debe únicamente al contenido de peróxido de hidrogeno, aunque precisamente liberación de agua oxigenada en mieles diluidos es responsable de la actividad antibacterial de otras mieles. Esta actividad única de la miel de Manuka se le atribuye a la presencia de metilglioxal. El origen del MG en este tipo de miel no ha sido determinado, aunque es bien sabido que la actividad del peróxido y la cantidad de metilglioxal aumenta con el almacenamiento [66].



Figura I.9. Flor del árbol de Manuka ((*Leptospermum scoparium*))

I.7 Otras fuentes de exposición del hombre a compuestos α -dicarbonílicos.

En la actualidad se conocen que los compuestos dicarbonílicos están presentes en otras fuentes. Ejemplo de esto es el glioxal, que ha sido ampliamente utilizado en la industria química, como agente de entrecruzamiento para plásticos, agente de endurecimiento para el suelo o ingrediente para fertilización. También es detectado en emisiones de automóviles [67] y en el aire en zonas urbanas [68], debido a su formación a partir de compuestos orgánicos volátiles por fotooxidación en presencia de NOx [69], por reacción con ozono o con radicales hidroxilo [70]. El isopreno por ejemplo conlleva la emisión global de hidrocarburos y su reacción con hidroxilos del medio puede producir varios compuestos carbonílicos incluyendo el formaldehído, metalocreína, glioxal, metilglioxal entre otros, [71].

Recientemente MG ha sido descrito como uno de los productos de la desinfección de agua de consumo por ozonificación. DMG está relacionado con el olor y sabor de agua en el río Llobregat en España[72] debido a que el diacetil proviene de efluentes de industrias manufactureras de lubricantes y pipas de polietileno como fuentes antropogénicas.

I.8 Determinación de compuestos dicarbonílicos

Típicamente, las etapas del procedimiento analítico consisten en el pretratamiento dirigido a la eliminación de la matriz y pre-concentración de los analitos, su derivatización y la separación cromatográfica.

Actualmente se han estudiados varias matrices para el análisis de compuestos dicarbonílicos tales como orina [73, 74], plasma [75, 76], y en varios casos los alimentos. Cabe resaltar que matrices tanto de carácter biológico como alimenticio son usualmente complejas, por lo que la etapa de tratamiento de la muestra es crucial, lo que tiene que ver directamente con la cantidad en la que se encuentre el analito en la muestra a analizar. En el caso de muestras como orina y plasma se han reportado concentraciones de 1.1 a 160 $\mu\text{g/L}$ [77], y 5 a 120 $\mu\text{g/L}$ [77] para glioxal y metilglioxal respectivamente en pacientes sanos, mientras que para pacientes diabéticos se han reportado de 60 a 690 $\mu\text{g/L}$ [78], de 170 a 360 $\mu\text{g/L}$ [78, 79] y 64.6 $\mu\text{g/L}$ [73] para glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal respectivamente, cabe decir que estas concentraciones dependen del estado de salud de los pacientes así como su etapa de avance de enfermedad. En el caso de alimentos, las concentraciones reportadas varían con respecto al alimento analizado, en el caso de bebidas con alto contenido de azúcar, se han reportado concentraciones de 181 $\mu\text{g/L}$ para G y 3660 $\mu\text{g/L}$ [80] para MG, mientras que en mieles son de 0.8 mg/kg, 2,0 mg/kg y 2.52 mg/kg [81] para G, MG y DMG respectivamente, mientras que en miel de Manuka la cantidad de DMG ha sido reportada entre 100 y 250 mg/kg [64]. En las Tablas I.1 y I.2 se muestran más ejemplos de trabajos enfocados en el análisis de orina y de alimentos.

Para compuestos dicarbonílicos los procedimientos de su determinación son basados principalmente en la derivatización, aunque existen ejemplos donde no se requiere la derivatización; tal es el caso de la sorción de analitos por agitación de barras magnéticas, seguido por desorción líquida y análisis en cromatografía de líquidos con detector de arreglo de diodos (SBSE(DAN)in-situ-LD-HPLC-DAD) [82, 83], el uso de técnicas electroquímicas [84] o determinación por electroforesis capilar [85].

La derivatización de los analitos es requerida para aumentar su estabilidad y también mejorar las propiedades que deciden sobre la separación cromatográfica y la sensibilidad de la detección.

En general la derivatización de compuestos dicarbonílicos representa grandes ventajas, particularmente porque son reacciones de carácter selectivo, se llevan a cabo a tiempos de reacción convenientemente bajos, confiriendo características particulares al analito. Ejemplo de esto es el

cambio en la polaridad del analito derivatizado para su separación por cromatografía de líquidos, o en el caso de la cromatografía de gases, la formación de compuestos volátiles, semi-volátiles y termoestables. La derivatización es también importante para la etapa de detección/cuantificación. Por ejemplo el proceso de derivatización es necesario para alcanzar selectividad y sensibilidad requeridas en el análisis por HPLC, particularmente cuando se utiliza el detector espectrofotométrico [77], o fluorimétrico, en estos casos la derivatización tiene como el fin conversión de los analitos en compuestos que absorben en la región UV/Vis o en compuestos fluorescentes[74].

En el caso de los compuestos dicarbonílicos la reacción de derivatización general que se lleva a cabo es la de la condensación de los grupos carbonílicos presentes en el analito con compuestos que contienen grupos amino unidos a anillos aromáticos tales como diamino derivados de benceno y naftaleno. En la Figura I.10, se muestra el esquema general de derivatización de compuestos α -dicarbonílicos con compuestos diamino derivados [49, 86-92].

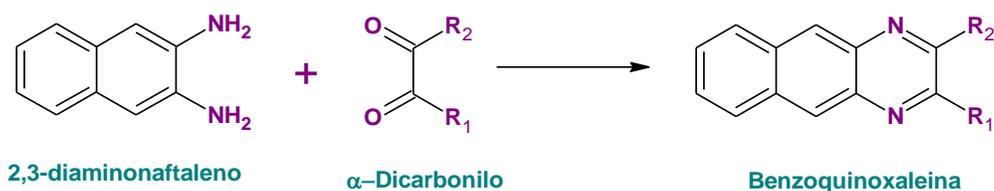


Figura I.10. Esquema de la derivatización α -DC con DAN

Además de 2,3-diaminonaftaleno, se han propuesto varios agentes derivatizantes para aplicaciones en diferentes tipos de matrices [93-95] todos ellos siguen el esquema general de la Figura 10. En las Tablas I.1 y I.2 se muestran algunos ejemplos encontrados en la literatura, enfocándose en el análisis de muestras biológicas y en alimentos.

Por ejemplo, glioxal ha sido determinado junto con otros aldehídos y cetonas con métodos de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) lo cual es generalmente aplicado para muestras en aire, sin embargo, glioxal no ha sido incluido como un analito, puesto que su detección no ha sido fácil, dada su alta reactividad. Además se ha utilizado o-ftalaldehído (OPA), el cual forma tanto mono como bis DNP-hidrazonas; sin embargo el uso de este reactivo derivatizante conlleva problemas de determinación, debido a que muchos compuestos dicarbonílicos llegan a formar mono-hidrazona, lo que representa complicaciones considerables para análisis cromatográficos [96]. Otro compuesto

reportado para la derivatización principalmente de glicoxal y metilglicoxal es el 1,2-diaminobenceno (OPD) [97, 98], mientras que otros autores han utilizado la derivatización con o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina PFBOA. En la Figura I.11, se observa un esquema de la derivatización de MG con diferentes reactivos derivatizantes, sin embargo otros compuestos dicarbonílicos pueden reaccionar bajo el mismo esquema.

Una vez elegido el reactivo derivatizante para la muestra a analizar es necesario elegir las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción con alto rendimiento, tomando en cuenta sobre todo las concentraciones de los reactivos, el pH, la temperatura, el tiempo, acceso de luz, etc. De manera general, la reacción siempre requiere el uso de un exceso del reactivo y se han reportado las condiciones desde 60 °C durante 45 min hasta 4 °C durante 20 horas.

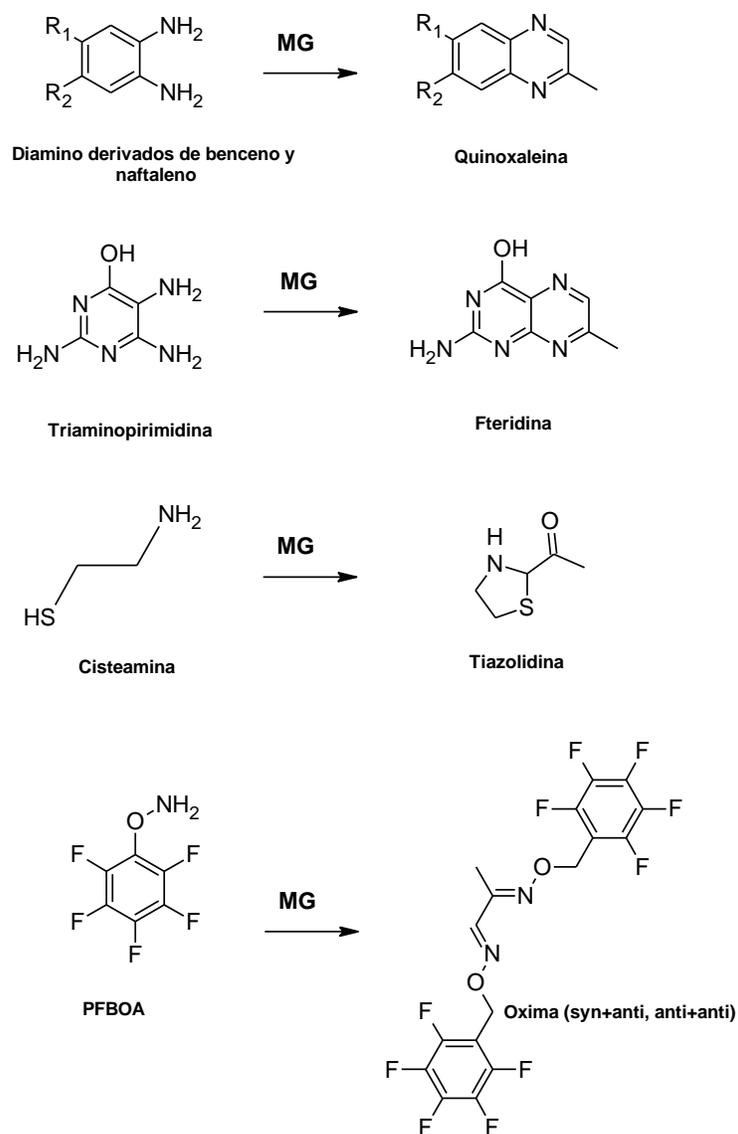


Figura I.11. Esquema de las reacciones de derivatización de metilgloxal con (a) diamino-derivados de benceno y naftaleno para formar derivados de tipo quinoxalina; (b) 6-hidroxi-2,4,5-triaminopirimidina (TRI) para formar 6-metilpteridina; (c) cistamina para formar 2-acetiltiazolidona y (d) o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil) hidroxilamina (PFBOA) para formar derivados de la oxima [99].

Finalmente, antes de introducir la muestra en la columna, se puede llevar a cabo la purificación/pre-concentración de los compuestos de interés mediante extracción líquido-líquido o mediante la extracción en fase sólida con evaporación del disolvente [49, 87, 88, 90]. De manera general la Figura I.12 muestra el orden general que se sigue para el tratamiento de muestras.

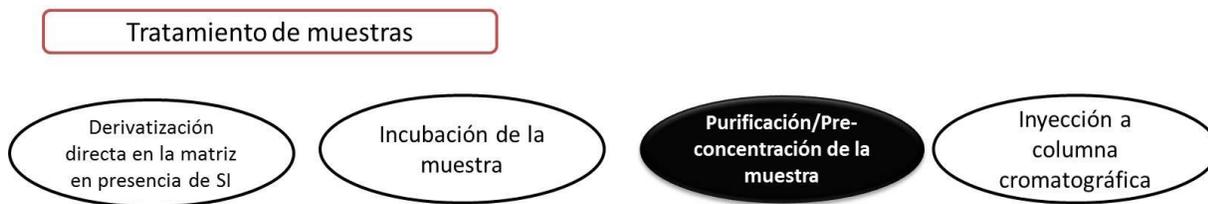


Figura I.12. Pasos del tratamiento para el análisis de compuestos dicarboxílicos en matrices químicamente complejas.

TABLA I.1 Determinación de G, MG y DMG en muestras biológicas, por diferentes técnicas cromatográficas, y diferentes métodos de derivatización

Muestra	Reactivo Derivatizante	Técnica Analítica	Condiciones de Derivatización				Límites de detección (LD) y Concentración (C)						Referencia
							G		MG		DMG		
			Temperatura	Tiempo	pH	Tiempo de Separación	LD	C	LD	C	LD	C	
Orina control	DCDB	GC-ECD	40°C	90min	pH 1	~15min	nr	nd	nr	nd	10 nM 1-100 µM	1.73 ± 0.04 nmol/mg*	[100]
Orina control	TRI	HPLC-FLD	65 °C,	45 min	pH 2.9	12min	32 pmol 0-41 µM	13.18 µM	11 pmol 0-25 µM	1.50 µM	99 pmol 0-24 µM	2.10 µM	[101]
Orina control	DDB2	HPLC-FLD	60 °C,	15 h,	pH 4.5	45min	NE 0.4 - 16 nmol	50-250 µM 2.9-14.9 mg/l 4.7 ± 1.4 µg/mg*	NE 0.4 - 14 nmol	20 - 100 µM 1.4-7.2 mg/l 2.2 ± 0.7 µg/mg*	nr	nd	[89]
Orina control	DDP	HPLC-DAD/FLD	60 °C,	30 min	pH 10	10min	5.30 µg/l arriba de 160 µg/l	19.02 µg/l 0.43-1.50 µg/mg*	6.71 µg/l up to 95 µg/l	24.07 µg/l 0.30-0.90 µg/mg*	nr	nd	[102]
Orina control	DAN	SBSE-HPLC-DAD	Room temp. 0.5M HClO4	nr	nr	12min	1.1 µg/l # 5-120 µg/l	268.9±6.3 µg/l	1.5 µg/l 5-120 µg/l	94.1±3.2 µg/l	nr	nd	[91]
Orina de diabeticos	DAP	GC-FID	60 °C,	10 min	pH 3	4min	nr	Nd	40 µg/l 90- 1040 µg/l	170-250 µg/l	50 µg/l 160-1170 µg/l	nf	[103]
Orina de diabeticos	DDB1	GC-FID	50 °C,	10 min	pH 4	16min	20 µg/l 60-690 µg/l	170-400 µg/l	10 µg/l 50- 1010 µg/l	190-360 µg/l	10 µg/l 70-1330 µg/l	nf	[104]
Orina de diabeticos	TBA	CE-AD	75 °C,	90 min	pH ~1.7	16min	1.0 µg/l	20.1-21.1 µg/l 64.1-71.4 µg/l	0.2 µg/l	11.7-12.2 µg/l 29.4-127.2 µg/l	-	nd	[85]

TABLA I.1 (Continuación) Determinación de G, MG y DMG en muestras biológicas, por diferentes técnicas cromatográficas, y diferentes métodos de derivatización

Muestra	Reactivo Derivatizante	Técnica Analítica	Condiciones de Derivatización				Límites de detección (LD) y Concentración (C)						Referencia
							G		MG		DMG		
			Temperatura	Tiempo	pH	Tiempo de Separación	LD	C	LD	C	LD	C	
Orina de diabeticos	TRI	HPLC-FLD	85 °C,	60 min	pH 3.5-7	16-20min	0.16 µg/l 1-10 µg/l	0.30-1.1 µg/mg* 0.57-0.84 µg/mg*	0.44 µg/l 1-15 µg/l	0.1-0.3 µg/mg* 2.0-3.8 µg/mg *	0.43 µg/l 1-10 µg/l	nf	[105]
Orina de diabeticos	4MPD	HPLC-FLD	40 °C,	4 h	pH 7.4	12min	0.46 µg/l 25-200 µg/l	17.0 – 43.2 71.2 – 175	0.39 µg/l 25-200 µg/l	17.3 – 27.0 53.8 - 249	0.28 25-200 µg/l	13.2 ± 1.6 µg/l 64.6 ± 3.4 µg/l	[73, 106]
Uñas humanas	DMPD	UHPLC-ESI-TOF	60°C	2 horas	nr	8 min	50 fmol	0.59 pmol VS 0.60 omol VD	0.10 fmol	1.03 pmol VS 1.41pmol VD	---	---	[37]

C-Concentración encontrada; * - Normalizado por creatinina en orina; **nd** - no determinado; **nf**-no encontrado; **nr**-no reportado; **AD**-detección amperométrica; **NE**- No especificado; **CE**-electroforesis capilar; **DAN**-2,3,diaminonaftaleno; **DAP**- 1,2-diaminopropano; **DCDB**-4,5-dicloro-1,2-diaminobenceno; **DDB**-2,3-Diamono-2,3-dimetilbutano; **DDB2**-1,2-diamino-4,5-dimetilenedioxibenceno; **DDP**-sulfato de 5,6-diamino-2,4-hidroxipirimidina; **DMB**-1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno; **SBSE**-Extracción con sorción con agitación magnética; **TBA**-ácido 2-tiobarbiturico; **TRI**-6-hidroxi-2,4,5-triaminipirimidina; **4MPD**-4 –metoxi-o-fenilendiamina; **OPD**-Orto-fenilendiamina; **DNPH**-2,4-dinitrofenilhidrazina; los valores presentados en esta tabla corresponden a los LD instrumentales, los valores evaluados considerando pre-concentración con SBSE son 15 ng/l y 25 ng/l para G y MG, respectivamente con un tiempo de extracción de 18 horas; ** HCl diferentes concentraciones (0.01, 0.1,0.15,0.25,0.5 y 1 mM); **NFP**- National Forest Park; **SUB**- Shangai University of Baoshan; **DMPD**- 4,5-dimetil-1,2-fenilendiamina; **VS**- Voluntarios sanos; **VD**- Voluntarios Diabéticos.

TABLA I.2 Determinación de G, MG y DMG en muestras de alimentos, por diferentes técnicas cromatográficas, y diferentes métodos de derivatización

Muestra	Condiciones de Derivatización						Límites de detección (LD) y Concentración (C)						Referencia
	Reactivo Derivatizante	Técnica Analítica	Temperatura	Tiempo	pH	Tiempo de Separación	G		MG		DMG		
							LD	C	LD	C	LD	C	
Agua de río Llobregat España	---	SPME-GC-MS	60°C	30 min	nr	24min	nr	nd	nr	nd	0.08 µg/l	0.20 µg/l	[72]
Miel de Manuka	OPD	RP-HPLC-UV	TA	NE	pH 6.5	13min	nr	nd	nr	nd	nr	250mg/kg 70- 100mg/kg	[64]
Aire	DNPH	HPLC	TA	30 min	HCl**	40 min	2.52µg/L	792ng/m3 NFP 475 ng/m3 SUB	19.3 µg/L	143ng/m3 NFP 121 ng/m3 SUB	---	---	[71]
Miel de Manuka	---	HPLC	----	---	----	>55	---	---	---	Solo identificado	---	---	[66]
Bebidas Carbonatadas altas en HFCS	OPD	HPLC	60°C a 50 rpm	30 min	nr	nr	nr	[18.1 ± 0.8 µg /100mL 50.8 ± 0.2 µg /100mL 32.7 ± 1.5 µg /100mL]***	nr	[385.1 ± 7.5 µg /100mL 112.4 ± 0.1 µg /100mL 366± 19.5 µg /100mL]***	---	---	[80]
Mieles	OPD	HPLC-DAD HPLC-MS HPLC-MS/MS HPLC-TOF-MS				10 min	nr	0.8mg/Kg****	nr	2.0mg/kg****	nr	0.3mg/kg	[81]

TABLA I.2 (Continuación). Determinación de G, MG y DMG en muestras de alimentos, por diferentes técnicas cromatográficas, y diferentes métodos de derivatización

Muestra	Condiciones de Derivatización						Límites de detección (LD) y Concentración (C)						Referencia
	Reactivo Derivatizante	Técnica Analítica	Temperatura	Tiempo	pH	Tiempo de Separación	G		MG		DMG		
							LD	C	LD	C	LD	C	
Cerveza Vino Vinagre balsámico Salsa de soya Endulzantes Pan, Galletas y Pretzels	OPD	HPLC-UV	Temperatura ambiente	Una noche	pH=7	50 min	0.28 mg/Kg	Nd	0.23 mg/kg	0.7 mg/L 0.5 mg/L 8.9 mg/L 8.1 mg/L 3.6 mg/L 3.0, 8.3 y 3 mg/L	---	---	[107]
Cerveza	PFBHA	SPME + GC-MS	60 °C	nr	nr	>36 min	15.240µg/L	4.5 µg/L	10-768µg/L	3.2 µg/L	24-640 µg/L	10 µg/L	[108]
Balsamic Vinegar Red Wine Aditivo de caramelo	OPD	RP-HPLC-DAD	37°C	1 hr	pH=3	70 min	0.043 mg/mL	1.02-3-87 µg/mL	0.072 mg/mL	0.78-4.68 µg/mL	0.542mg/mL	0.32-13.99 µg/mL	[109]

OPD-Orto-fenilendiamina; **DNP**H-2,4-dinitrofenilhidrazina; los valores presentados en esta tabla corresponden a los LD instrumentales, los valores evaluados considerando pre-concentración con SBSE son 15 ng/l y 25 ng/l para G y MG, respectivamente con un tiempo de extracción de 18 horas; ****** HCl diferentes concentraciones (0.01, 0.1,0.15,0.25,0.5 y 1 mM); **NFP**- National Forest Park; **SUB**- Shangai University of Baoshan; ; **HFCS**- Alta concentración de fructuosa de jarabe de maíz;*** Concentraciones en tres diferentes tipos de bebida; **** Medias calculadas a partir de cantidades detectadas de varias muestras; **PFBHA**- o-(2,3,4,5,6-prntafluorobenzil)-hidroxilamina;

En la Figura I.12, se muestra también que durante el tratamiento de muestras es imprescindible el uso de un estándar interno (EI), con el objetivo de controlar los errores que se pueden cometer en el procedimiento analítico, que generalmente es compuesto por varias etapas, Para que el estándar interno pueda cumplir con su función este compuesto debe ser adicionado a la muestra al principio del protocolo de tratamiento.

Los criterios de selección de un estándar interno apropiado incluyen tanto la estructura como las propiedades fisicoquímicas semejantes a los de los analitos, formación de derivados con el agente seleccionado, resolución cromatográfica de los derivados del EI y de los solutos de interés y al mismo tiempo que éste se encuentre ausente en las muestras reales. La mayoría de compuestos utilizados son dimetilglioxal (2,3-butanodiona) [24, 49, 87], 2,3-pentanodiona [89], 3,4-hexanodiona [99] y 2,3-hexanediona [90].

Una vez preparada la muestra, se realiza el análisis cromatográfico, en el cual se tienen que seleccionar las condiciones de separación que dependerán de la técnica cromatográfica con la que se pretenda llevar a cabo el análisis. La técnica más utilizada para la determinación de compuestos dicarbonílicos es HPLC con diferentes tipos de detectores. En la Tablas I.1 y I.2 se aprecia que los detectores más utilizados han sido el espectrofotométrico de arreglo de diodos (DAD) y fluorimétrico (FLD). Cabe resaltar que los tres compuestos, G, MG y DMG, prácticamente han sido determinados en una sola corrida, que en varios trabajos los límites de detección (LD) han sido relativamente altos, además cabe añadir que los tiempos de incubación así como los tiempos de corrida cromatográfica han sido elevados, lo que hace que estos procedimientos son poco prácticos.

Otra técnica cromatográfica utilizada es la cromatografía de gases con detector de ionización en llama (GC-FID), donde se han reportado valores de LD de 60 a 690 $\mu\text{g/L}$, 50-1010 $\mu\text{g/L}$ y 70-1330 $\mu\text{g/L}$ para G, MG y DMG, respectivamente, siendo esta técnica menos sensible que las reportadas para HPLC [103]; de ahí que el GC-FID parece poco viable cuando los compuestos dicarbonílicos se encuentran en bajas concentraciones (del orden de partes por billón en las muestras reales).

Existen reportes sobre el uso de las técnicas cromatográficas con detección por espectrometría de masas; tal es ejemplo de la determinación de G, MG y DMG en cerveza que se reporta en la Tabla I.2, donde los límites de detección son más bajos con respecto a la GC-FID y HPLC, siendo de 15 a 240 $\mu\text{g/L}$, para G, de 10 a 768 $\mu\text{g/L}$ para MG y de 24 a 640 $\mu\text{g/L}$ para DMG [107].

Con base en la revisión bibliográfica que se acaba de presentar, para la determinación de G, MG y DMG en este trabajo se decidió utilizar dimetilglioxal (DMG) como EI, el 4 -metoxi-o-

fenilendiamina (4MPD) como agente derivatizante y la técnica de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS). La idea original fue lograr cuantificación de tres compuestos mediante la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) esperando altos valores de la relación señal/ruido y por lo tanto bajos límites de detección/cuantificación.

II. JUSTIFICACIÓN

Es necesaria la determinación de compuestos dicarbonílicos debido a la importancia que tienen como precursores de formación de AGEs no solamente cuando están generándose de manera endógena sino también cuando provienen de fuentes exógenas (alimentos, bebidas). Generalmente la determinación de compuestos dicarbonílicos representa un reto, por lo que se buscan los procedimientos que requieren poco manejo de muestra que sean relativamente rápidos y que ofrecen límites de cuantificación suficientemente bajos para su uso en el análisis de muestras biológicas y en alimentos.

III. OBJETIVO

El objetivo principal del proyecto de tesis es establecer un nuevo procedimiento analítico para la cuantificación de G, MG y DMG en materiales biológicos y alimenticios por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, así como demostrar su utilidad en el análisis de muestras reales con matriz química compleja.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

IV.1. Reactivos, Disolventes

- ◆ Glioxal (G), Sigma Aldrich
- ◆ Metilglioxal (MG), Sigma Aldrich
- ◆ Dimetilglioxal (DMG), 2,3-Butanidiona, Sigma Aldrich
- ◆ Fenilglioxal (FG), Sigma Aldrich
- ◆ Dietilglioxal (DEG), 3,4-Hexanodiona Sigma Aldrich
- ◆ 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MFD)
- ◆ Mercapto-etanol (ME)
- ◆ Tampón fosfatos pH=7.4
- ◆ Agua desionizada
- ◆ 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MPD)
- ◆ 1,2-Diaminopropano (DAP)

IV.2 Instrumentación analítica

- ◆ Cromatógrafo de gases con detección por ionización con flama (GC-FID), con automuestreador. Modelo Clarus 500 de Perkin Elmer. Columna cromatográfica tipo ZB-5 (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) de Phenomenex.
- ◆ Cromatógrafo de gases con detección de masas de triple cuadrupolo (GC-MS(TQ)). Modelo Bruker Scion TM, GC-MS-TQ.

NOTA: Las condiciones cromatográficas se muestran en el Capítulo de Resultados y Discusión.

IV. 3 Muestras analizadas

IV.3.1 Muestras de mieles:

Las muestras de mieles a las que se les hizo el análisis fueron jarabes de maíz de alta fructuosa, jarabes de agave de alta fructuosa y miel de abeja natural, en la Tabla IV.1 se enlistan los tipos de miel en las que se llevaron a cabo el análisis.

Tabla IV.1. Tipos de mieles/jarabes en los que se hizo el análisis de presencia de G, MG y DMG por GC-FID.

Tipo de Jarabe/Miel	Numero/Nombre
Jarabes de agave de alta fructuosa	1-Fake
	2-Damro
	3-Endorg
	4-Maple Org

Jarabe de maíz de alta fructuosa	5-BB caro
	6-Endol
	7-Jarabe
Jarabe de Maple	8-Karo Maple
Miel de Abeja	9-Abeja

IV.3.2 Muestras de orina:

Fueron proporcionadas por la División de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guanajuato; se tomaron muestras de orinas de diferentes grupos de pacientes. Pacientes Sanos (Pn), pacientes diabéticos sin complicaciones (DSn) y pacientes diabéticos con complicaciones (DCn). Donde “n” representa el número de paciente. Se analizaron 5 muestras de cada grupo con tres repeticiones cada una.

IV. 4 Programas de software

- ◆ Microsoft Office 2010
- ◆ TotalChrom Navigator, versión 6.2.1 para controlar el cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer
- ◆ Programa Grams 8.0 para conversión de formato de datos de GC-FID
- ◆ Agilent Chemstation. Data Analysis (Instrument #1 offline), tratamiento de datos de GC-FID
- ◆ MSWS: System Control-Bruker GC/Ms #1, como control de GC-MS(TQ) Bruker Daltonics
- ◆ MS Data Review- [Plots Chromatograms and Spectra]
- ◆ ACD/ChemSketch, para dibujo de moléculas químicas.

A continuación se presentan las condiciones establecidas para cada uno de los procedimientos desarrollados en este trabajo.

IV.5. Reacciones de derivatización

IV.5.1. Derivatización con 1,2-Diaminopropano

A cada una mezcla de estándares de concentración 0.5 mg/mL conteniendo el EI (1mg/mL) se agregaron 200 µL de tampón de acetatos pH 3 a concentración 0.1M además 20 µL del reactivo derivatizante DAP (10mg/mL) y se incubó la mezcla a 60°C por 30 minutos. A continuación, se agregaron 500 µL de cloroformo, se agitó en vortex y se separó la fase orgánica. Finalmente se agregó NaSO₄ anhidro a la fase orgánica y se inyectó al sistema GC-FID.

IV.5.2 Derivatización con 4-metoxi-o-fenilendiamina

A cada una de las soluciones de calibración (Tabla IV.2) o de las muestras reales se agregaron 50 µL de EI de concentración 1mg/mL y se llevaron a un volumen final de 500 µL; se agregaron 20 µL de 2-mercaptoetanol, 400 µL de tampón fosfatos (pH 7.4) con concentración de 100 mM Y 40 µL de reactivo derivatizante de concentración 10 mg/mL, la muestra se incubó a 60°C por un tiempo de 30 minutos. Las metoxiquinoxalinas se extrajeron con 500µL de acetato de etilo, la fase orgánica se separó, se secó con Na₂SO₄ anhidro para su subsecuente inyección al sistema GC-FID.

IV.6 Determinación de G, MG, DMG en mieles por cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID)

IV.6.1. Soluciones de calibración y tratamiento de muestras

Se prepararon soluciones individuales de G, MG, DMG, DEG y FG con concentración de 10 mg/mL cada una, usando los reactivos de Sigma Aldrich.

A partir de las soluciones individuales, se preparó una mezcla de G, MG y DMG, diluyendo 20 veces cada uno de los estándares individuales y obteniendo una concentración final de 0.5 mg/mL para cada uno de los analitos; para el EI se hizo una dilución de 10 veces y la concentración final en la solución mixta fue de 1 mg/mL, el reactivo derivatizante no se diluyó, quedando la concentración a 10 mg/mL. Se prepararon las soluciones estándares conteniendo tres analitos y EI de acuerdo con la información presentada en la Tabla IV.2. Se derivatizó, mediante el procedimiento de la **Sección IV.5.2**, para cada una de las diluciones y se inyectaron a GC-FID. Los datos se trataron en el software Agilent Chemstation.

Tabla IV.2. Elaboración y composición de las soluciones estándar para proceso de calibración por GC-FID

Volumen (µL)				Concentración final (mg/mL)	
Mix*	EI**	H ₂ O	Volumen Final	Mix	EI
200	50	250	500	0.20	0.1
150	50	300	500	0.15	0.1
100	50	350	500	0.10	0.1
50	50	400	500	0.05	0.1
20	50	430	500	0.02	0.1

0	50	450	500	0	0.1
---	----	-----	-----	---	-----

*Mix-meزcla de G, MG y DMG (Concentraci3n inicial 0.5 mg/mL de cada uno de los analitos); EI-Est3andar interno, en este caso fenilglioخal(Concentraci3n inicial 1 mg/mL).

Para el an3lisis de G, MG y DMG en muestras de mieles y jarabes, se pesaron aproximadamente 0.2 g de cada una de las muestras de miel (Tabla IV.3), se agreg3 el EI para tener su concentraci3n final 0.1 mg/mL (igual que en las soluciones de calibraci3n) y se complet3 el volumen agregado a 500µL con agua desionizada; se llev3 a cabo la derivatizaci3n con 4MPD tal como se describe en la Secci3n IV.5.2.

Tabla IV.3. Cantidades pesadas de cada una de las muestras de miel para su an3lisis en GC-FID

Miel	Cantidad pesada (g)
Fake	0.24
Damro	0.23
Endorg	0.26
Maple Org	0.23
BB caro	0.28
Endol	0.25
Jarabe	0.31
Karo Maple	0.24
Abeja	0.23

IV.6. 2 An3lisis por cromatograf3a de gases con detector por ionizaci3n en flama (GC-FID)

Despu3s de haber variado varios par3metros para el an3lisis cromatogr3fico se llev3 a cabo el an3lisis de presencia de G, MG y DMG en mieles/jarabes por GC-FID se obtuvieron las mejores condiciones de trabajo, las cuales se muestran en la Tabla IV.4

Tabla IV.4. Condiciones instrumentales seleccionadas para el an3lisis de compuestos dicarbon3licos en GC-FID.

Columna	Phenomenex: ZB-5 (3 m diámetro interno 0.25m, grosor de película 0.25µm)		
Gas acarreador	Tipo= Hidrógeno	Flujo de gas acarreador= 1.6 mL/min	
Inyección	Split 1:10	Volumen = 1µL	
Inyector	Temperatura 240 °C	Tipo =PPC	
Programa de temperatura	°C/min	Temperatura °C	Permanencia, min
	Inicio	80	1
	20	240	1
Tiempo total de análisis	10 min		
Temperatura del detector	320 °C		
Gas del detector	H ₂ = 45 mL/min; aire extra seco= 450 mL/min		

IV.6 Análisis de muestras biológicas por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-TQMS(TQ))

IV.6.2. Desarrollo de las condiciones de análisis de masas

- Se tomaron los estándares individuales de G, MG y DMG con concentración 10 mg/mL y se hizo una mezcla de estándares de concentración 0.25 mg/mL
- Se hizo una mezcla de fenilglioxal y dietilglioxal a una concentración de 1 mg/mL
- Se tomaron 400 µL de la mezcla de analitos y 50 µL de la mezcla de los EI quedando un volumen final de 500 µL. Las concentraciones finales obtenidas fueron 0.2 mg/mL para la mezcla de estándares, y para los ES de 0.1 µg/µL.
- Se derivatizó por el proceso de la **Sección IV.5.3**.
- Se inyectó al equipo GC-MS(TQ) en modo FULL SCAN en un intervalo de 100 a 250 m/z.
- Después se establecieron los iones más abundantes en los espectros de masas para cada analito.
- Se hicieron diluciones de la muestra inicial (0.2 µg/µL) a 100, 1000 y 10000 veces.
- Se corrieron las muestras diluidas primero en modo de ionización selectiva (SIM), con la selección de picos de masas más abundantes.
- Después se corrieron en modo PRODUCT para obtener otro patrón de fraccionamiento y tener picos de abundancia de referencia más específica para cada analito.
- Finalmente se corrió las muestras en modo de reacciones múltiples (MRM) para tener mayor sensibilidad y especificidad del método.
- Ya establecidas las condiciones cromatográficas y de masas se comenzó a hacer la curva de calibración.

IV.6.3 Proceso de calibración

- ◆ Se prepararon soluciones individuales de G, MG, DMG, DEG y FG con concentración 25mM cada una, usando los reactivos de Sigma Aldrich.
- ◆ A partir de las soluciones individuales, se preparó una mezcla de G, MG y DMG, diluyendo 1000 veces y se obtuvo una concentración de 2.5 μM , el estándar interno se diluyó 500 veces teniendo una concentración de 50 μM . El reactivo derivatizante (4MPD) se preparó a una concentración de 1 mg/mL.
- ◆ Se hizo la curva de calibración a partir de las soluciones estándares ya preparados para la determinación de G, MG y DMG. En la Tabla IV.5 se muestran las diluciones hechas para los diferentes puntos de la curva.

Tabla IV.5. Preparación de la curva de calibración de GC-MS(TQ)

Volumen (μL)				Concentración final (μM)	
Mix	IS	H ₂ O	Volumen Final	Mix	IS
0	50	450	500	0	5
100	50	350	500	0.5	5
200	50	250	500	1	5
300	50	150	500	1.5	5
400	50	50	500	2	5

Teniendo tres repeticiones de cada uno de los puntos, se hizo la reacción de derivatización y los los datos se analizaron en el software MS Data Rewiew (Plot, Chromatograms and Spectra).

IV.6.4. Tratamiento de muestras

- ◆ Se tomó 1mL de la muestra de orina previamente refrigerada
- ◆ Se centrifugó a 10 000g x 5 minutos
- ◆ Se tomaron 3 alícuotas de 100 μL cada una
- ◆ Se agregó 50 μL del estándar interno (50 μM)
- Y se llevaron las tres repeticiones de acuerdo al procedimiento derivatizó de acuerdo al **Proceso IV.4.2.**
- Los datos se analizaron en el software MS Data Rewiew (Plot, Chromatograms and Spectra)

Tanto la curva de calibración como las muestras se hicieron en la misma corrida.

IV.6. 1 Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (GC-MS(TQ))

Tabla IV.6 Condiciones instrumentales utilizadas para el análisis de compuestos dicarbonílicos por GC-MS(TQ).

Columna	BR-5 (15m x 0.25mm, grosor de fase estacionaria de 0.25 μ m)		
Gas acarreador	Tipo= Helio	Flujo de gas acarreador= 1.0 mL/min	
Inyección	Split 1:10	Volumen = 1 μ L	
Inyector	Temperatura 250 $^{\circ}$ C		
Programa de temperatura	$^{\circ}$C/min	Temperatura $^{\circ}$C	Permanencia, min
	Inicio	80	2
	25	250	2.5
Tiempo total de análisis	10 min		
Detector	Masas triple cuadrupolo		
Línea de Transferencia	Temperatura= 250 $^{\circ}$ C		
Ionización por impacto de electrones (IE)	Energía=-70eV		
Modos de trabajo	FULL SCAN	SIM	MRM (Zona CID)
	m/z	m/z	m/z (eV)
	100-250	G= 160 MG=174 DMG=188 DEG=216 DFG=236	G=160 \rightarrow 117(26 eV) MG= 174 \rightarrow 106(28eV) DMG= 188 \rightarrow 106(21eV) DEG= 216 \rightarrow 201(21eV) DFG=236 \rightarrow 221 (18eV)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya se mencionó en la Introducción, la determinación de compuestos dicarbonílicos es un reto en química analítica, debido a alta reactividad de estos compuestos, estructura química que no permite su detección con detectores espectrofotométrico UV/Vis o fluorimétrico y también su relativamente alta volatilidad; sin embargo es de suma importancia su determinación ya que son intermediarios en la formación de AGEs y agentes tóxicos a nivel celular y como. Además su presencia en matrices como aire y agua, puede contribuir a que la contaminación de reactivos así como la de las muestras. Los analitos que se pretenden identificar y cuantificar en este proyecto son glioxal (G), metilglioxal (MG) y dimetilglioxal (DMG).

En primera estancia se inició con el proceso de derivatización conforme a lo reportado en la bibliografía. El objetivo de la derivatización pre-columna en cromatografía de gases es lograr un cambio estructural del analito, dándole ciertas propiedades como estabilidad térmica y atenuada volatilidad; en este caso en específico, los compuestos que se quieren analizar son de tamaño muy pequeño por lo que se pretende modificar la estructura inicial del analito mediante la reacción con un reactivo derivatizante (RD) con el fin de obtener compuestos de mayor estabilidad térmica. A su vez, como el estándar interno se eligió un compuesto con estructura similar a los analitos, que también llevara a cabo la misma reacción con el RD y que no es un componente natural de las muestras a analizar. Después se procedió con la selección de las condiciones de separación/detección de los cuatro compuestos utilizando cromatografía de gases con detector de ionización con flama (GC-FID). Finalmente, el procedimiento desarrollado se utilizó en el análisis de G, MG, DMG en muestras de mieles y jarabes.

La segunda parte del proyecto se enfocó en el análisis de los mismos compuestos, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (GC-MS(TQ)), buscando una mayor selectividad y sensibilidad para poder llevar a cabo la cuantificación de los compuestos dicarbonílicos a nivel de trazas, ya que muestras biológicas contienen bajas concentraciones de estos compuestos. Cabe señalar que el detector de triple cuadrupolo cuenta con diferentes modalidades de adquisición de datos; estas son FULL SCAN (Barrido Completo), SIM (Monitoreo Selectivo de Iones), PRODUCT (Producto), PRECURSOR (Precursor) y MRM (Monitoreo de Reacciones Múltiples). Los modos en los que se trabajó se discutirán a lo largo de este capítulo.

V.1 Desarrollo de la metodología de detección de Glioxal, Metilglioxal y Dimetilglioxal por Cromatografía de gases con detector de ionización por flama (GC-FID).

V.1.1 Selección del Reactivo Derivatizante (RD).

Debido al pequeño tamaño y a la alta reactividad de glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal (Figura V.1) se llevó a cabo la derivatización de estos para obtener un producto termoestable que soporte las condiciones de análisis en cromatografía de gases.

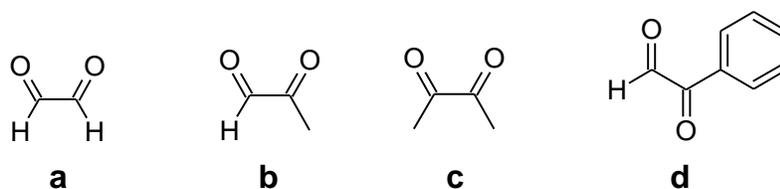


Figura V.1. Estructura química de los compuestos dicarbonílicos analizados por GC-FID a) Glioxal, b) Metilglioxal c) Dimetilglioxal d) Fenilglioxal (EI)

La selección del reactivo derivatizante se hizo a partir de lo reportado en la bibliografía, por lo que se comenzó a trabajar con 1,2-diaminopropano (DAP) reportado por Khuhawar [79] en el análisis de compuestos dicarbonílicos por cromatografía de gases (GC); dicha reacción se lleva a cabo a pH 3. Los productos formados en la reacción de los compuestos dicarbonílicos con DAP se esperan derivados de pirazinas los cuales se muestran en la Figura V.2.

Inicialmente se pretendía el uso del dimetilglioxal (DMG) como estándar interno, por lo que las pruebas iniciales se hicieron solamente con tres estándares, es decir, con glioxal, metilglioxal, y dimetilglioxal.

Para demostrar la eficacia de la derivatización y para conocer los tiempos de retención de cada uno de los compuestos, es requisito indispensable la asignación de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis de mezclas y en muestras reales. En primer lugar se llevó a cabo la derivatización de los estándares individuales con DAP (procedimiento descrito en la **Sección IV.5.2**).

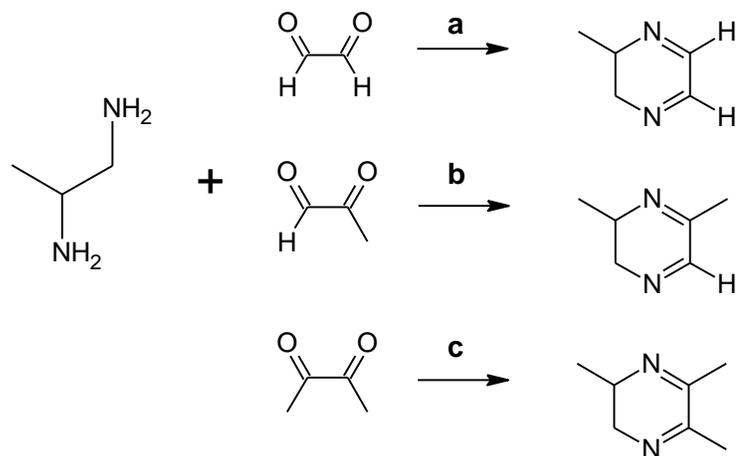


Figura V.2 Reacciones de derivatización de G, MG y DMG y productos esperados con 1,2-diaminopropano como reactivo derivatizante a) formación de 2-metil-2,3-dihidropirazina b) formación de 2,6-dimetil-2,3-dihidropirazina c) formación de 2,5,6-trimetil-2,3-dihidropirazina.

Cabe mencionar que el RD se agregó en exceso (10mg/mL) para asegurar que la reacción se lleve a cabo cuantitativamente. Se utilizó la columna capilar ZB-5 de Phenomenex (30m x 0.25mm x 0.25 μ m) y las condiciones de separación se eligieron experimentalmente, repitiendo el análisis de una mezcla de estándares. En estos experimentos se examinaron diferentes flujos en la columna y programas de gradiente de temperatura, buscando la separación de los derivados hasta línea base en un tiempo relativamente corto. Las condiciones finales se presentan en la Tabla IV.4

La concentración de los analitos en el paso de extracción fue de 0.5 mg/mL por lo que se utilizó un Split de 10:1, esto para no saturar el detector y que los picos cromatográficos se vean bien definidos tanto en altura como en el ancho de pico.

Se hicieron tres inyecciones, la primera correspondiente al blanco de reacción, donde solo se tenía al RD, la segunda donde se agregó lo que hasta este punto sería el estándar interno (DMG), y finalmente una mezcla de analitos junto con el estándar interno. En la Figura V.3 se muestran los cromatogramas obtenidos utilizando DAP como reactivo derivatizante; de acuerdo con lo esperado, en el cromatograma correspondiente al blanco solo aparece un pico al 132 segundos (2.20 min) que se le atribuye al exceso del DAP. Por su parte, en el cromatograma obtenido para la solución de DMG, se observa el pico correspondiente al DAP y un pico a 192 segundos (3.20 min), lo que indica que la derivatización de DMG se llevó a cabo. En el cromatograma de la mezcla de analitos solo se observan

los picos de DAP (2.20 min) y de DMG (3.20 min) lo cual es indicativo de que a las condiciones que se usaron no se lleva a cabo la derivatización de G y de MG.

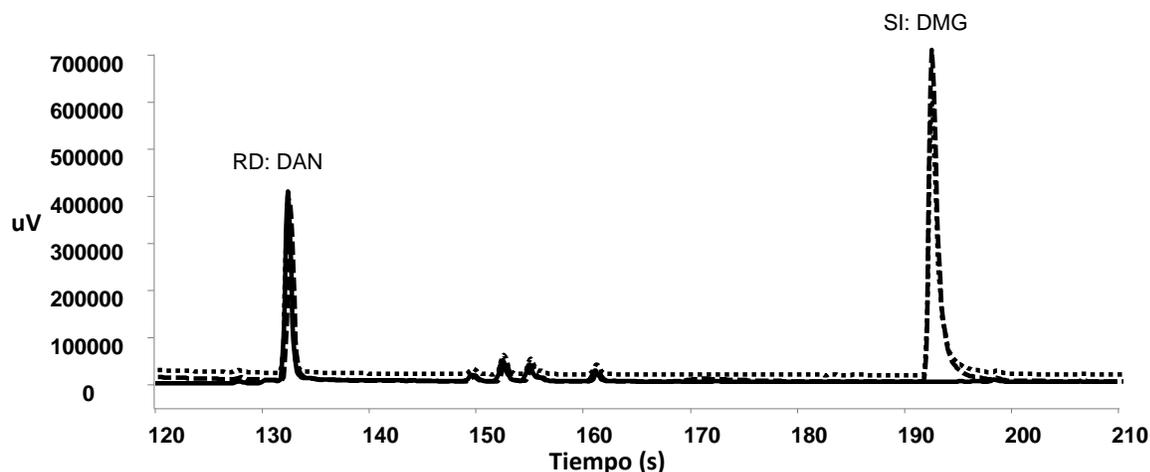


Figura V.3. Cromatograma GC-FID ; RD: DAP a pH=3, incubación de 30 min a 60°C y extracción con cloroformo: (—) Blanco; (---) SI (DMG); (...) Mezcla de estándares de analitos (G, MG) y SI (DMG)

Después de haber comprobado que el DAP no derivatiza a G y MG se probó otro reactivo derivatizante, 4-metoxi-o-fenilendiamina (4MPD), utilizado previamente en el análisis de los mismos compuestos por HPLC-FLD por Ojeda et al.[73]. La derivatización se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección IV.5.3**, a pH 7.4, incubándose a 60°C por 30 minutos, y extrayendo los derivados con acetato de etilo.

Los productos de la reacción son las respectivas metoxiquinoxaleinas de G, MG, DMG [73]; mismas que se muestran en la Figura V.4. La estructura y polaridad de estos productos es diferente a los obtenidos de la derivatización con 1,2-diaminopropano, por lo que es de esperarse que los tiempos de retención con el mismo método cromatográfico cambien.

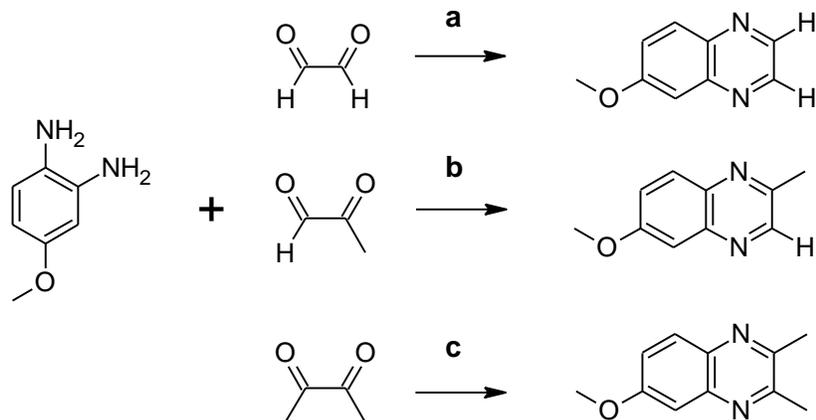


Figura V.4 Reacciones de derivatización de G, MG y DMG y productos esperados con 4-metoxi-o-fenilendiamina como reactivo derivatizante a) Formación de 6-metoxiquinoxaleína b) 6-metoxi-2-metilquinoxaleína c) Formación de 6-metoxi-2,3-dimetilquinoxaleína

De manera similar como para el primer reactivo derivatizante, se inyectó al sistema GC-FID un blanco que solo contenía al RD, luego se inyectó una solución que contenía solamente DMG y finalmente una mezcla de G, MG y DMG. La Figura V.5 muestra los cromatogramas obtenidos por GC-FID, donde se puede observar que en el blanco solo aparece un pico a 322 segundos (5.36 min) correspondiente al reactivo derivatizante (4MPD), mientras que en la muestra que contenía el DMG además del pico de 4MPD se ve otro pico a 393 segundos (6.55 min) lo que indica la exitosa derivatización del DMG; en el cromatograma correspondiente a la mezcla de los estándares se observan dos picos más, a 325 segundos (5.41 min) correspondiente a glioxal y a 358 segundos (5.99 min) correspondiente metilglioxal, lo que nos indica que el 4MPD es capaz de derivatizar los analitos que pretendemos cuantificar.

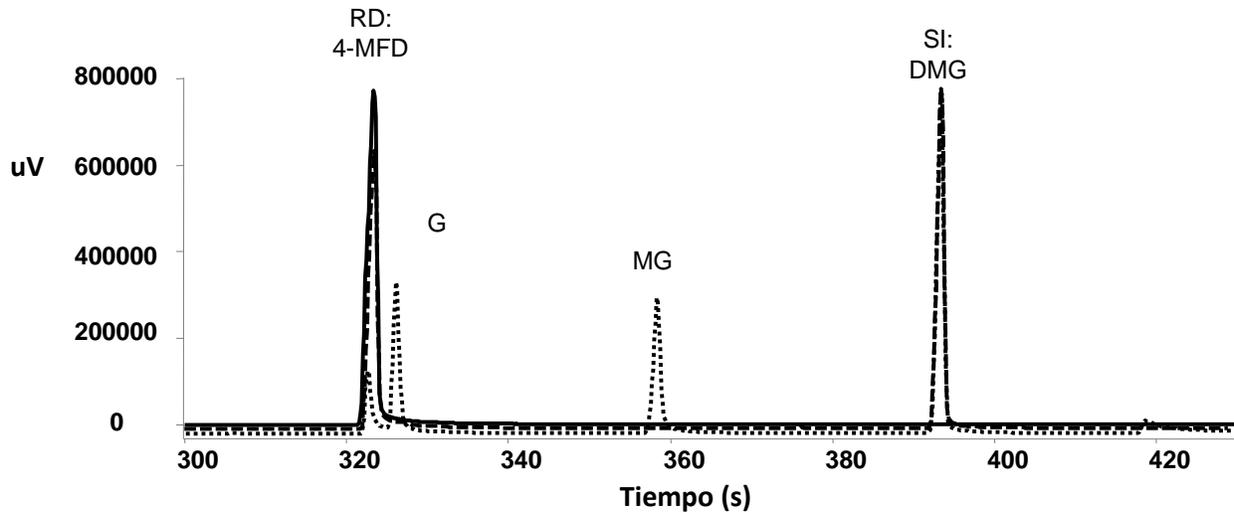


Figura V.5. Cromatograma GC-FID; RD: 4-MFD a pH 7.4, incubación de 30 min a 60°C y extracción con acetato de etilo: (—) Blanco; (---) EI (DMG); (...) Mezcla de estándares de analitos (G, MG) y EI (DMG). Concentración de G, MG [0.5 mg/L cada uno] y DMG [1mg/L].

Debido a lo anterior, se comprobó que el DAP a las condiciones que reporta el autor, no solo no derivatiza los analitos que nos interesa cuantificar en este proyecto, sino que incluso no derivatiza al MG como se reporta en el artículo. No así el 4MPD derivatiza a todos y cada uno de los compuestos que se pretendía que llevaran a cabo la reacción.

V.1.2 Selección del estándar interno (EI)

Ya comprobada la capacidad de reacción de 4MPD, se procedió con seleccionar un estándar interno más adecuado para el análisis de estos compuestos en alimentos, debido a que algunas fuentes reportan presencia del DMG tanto en matrices biológicas[73, 79, 102, 105] como alimenticias [29, 58, 59]. Se eligió fenilglioxal (FG) como un compuesto que no se encuentra en la muestra, que es estructuralmente similar a los analitos y que además reacciona con 4MPD formando respectiva metoxiquinoxaleina. Se llevó a cabo la reacción de derivatización de una mezcla de G, MG DMG y FG y en la Figura III.6 se muestra el cromatograma obtenido, donde se puede observar dos picos uno al minuto 7.95 y el otro al minuto 9.57.

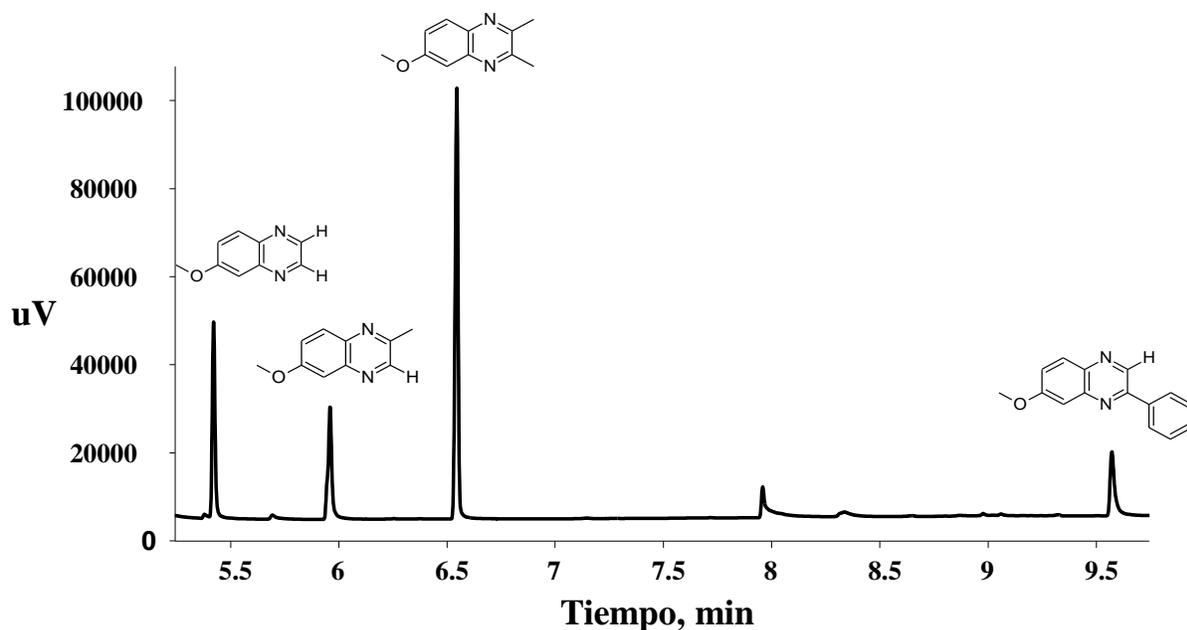


Figura V.6. Cromatograma GC-FID: Mezcla de estándares de G, MG y DMG [0.2 mg/mL cada uno] y FG [0.1 mg/mL] como EI; RD: 4MPD [10 mg/mL] a pH 7.4, incubación de 30 min a 60°C y extracción con acetato de etilo.

Para saber cuál de los picos correspondía al FG se comparó el cromatograma obtenido de la derivatización de los estándares con el cromatograma de un blanco que solo contenía al 4MPD y se sometió a las mismas condiciones de reacción (**Sección IV.5.3**); en la Figura V.7 se puede ver que el pico con tiempo de retención 7.95 min se presenta en ambos cromatogramas por lo que se lo adjudica a las impurezas o a un producto de descomposición de 4MPD; a su vez nos podemos percatar de un pico cuyo tiempo de retención es de 5.39 min que desaparece en el cromatograma de la mezcla de estándares, lo que nos indica que el 4MPD se consume conforme lleva a cabo la reacción.

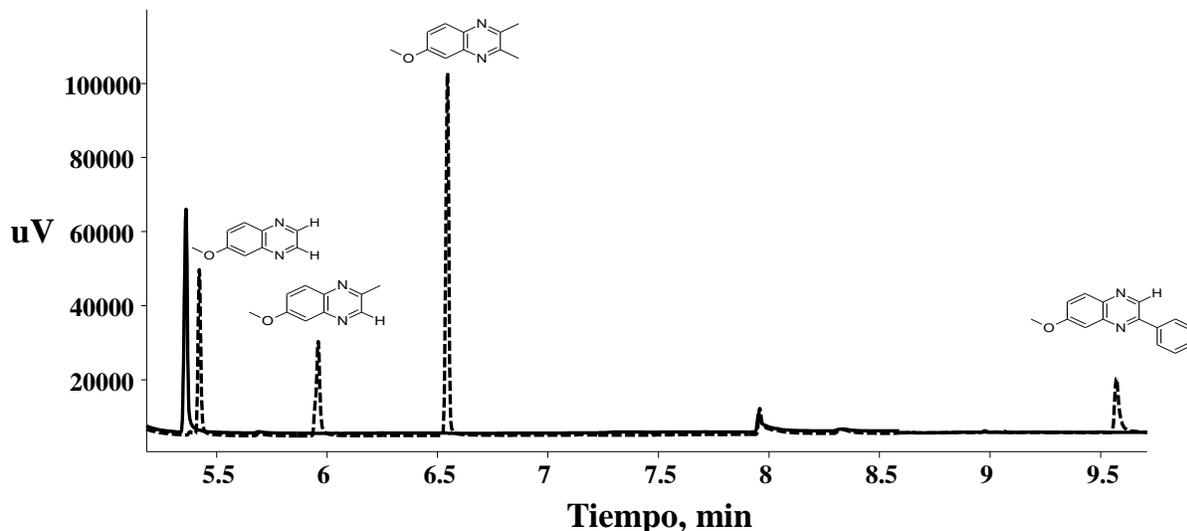


Figura V.7. Cromatogramas GC-FID de (-) 4MPD y (---) mezcla de estándares de G, MG, DMG y FG. Mezcla de estándares de G, MG y DMG [0.2 mg/mL cada uno] y FG [0.1 mg/mL] como EI; RD: 4MPD [10 mg/mL] a pH 7.4, incubación de 30 min a 60°C y extracción con acetato de etilo.

Con lo anterior se pudo comprobar que el fenilglioxal es viable como estándar interno, ya que tiene una estructura química similar a los analitos que se pretendían analizar y la derivatización la llevó a cabo satisfactoriamente.

V.1.3 Preparación de la curva de calibración para GC-FID

Teniendo las condiciones de derivatización, el estándar interno adecuado, y los tiempos de retención (Tabla V.2) de cada analito y del EI, se analizaron las soluciones de calibración, así como el análisis de algunas muestras de mieles.

Tabla V.2. Tiempos de retención de los analitos analizados así como los del estándar interno.

Analito	Tiempo de retención \pm DE (min)
Glioxal	5.39 ± 0.02
Metilglioxal	5.95 ± 0.01
Dimetilglioxal	6.55 ± 0.03
Fenilglioxal	9.57 ± 0.01

En la Figura V.8 se muestran los cromatogramas GC-FID obtenidos en el proceso de calibración. Se preparó una mezcla de estándares que tuviera la misma concentración de G, MG y

DMG (0.5 mg/mL cada uno) y se llevaron las diluciones para cada punto de la curva, agregando a cada uno el mismo volumen del estándar interno (1.0 mg/mL). La Tabla IV.2 muestra las correspondientes diluciones.

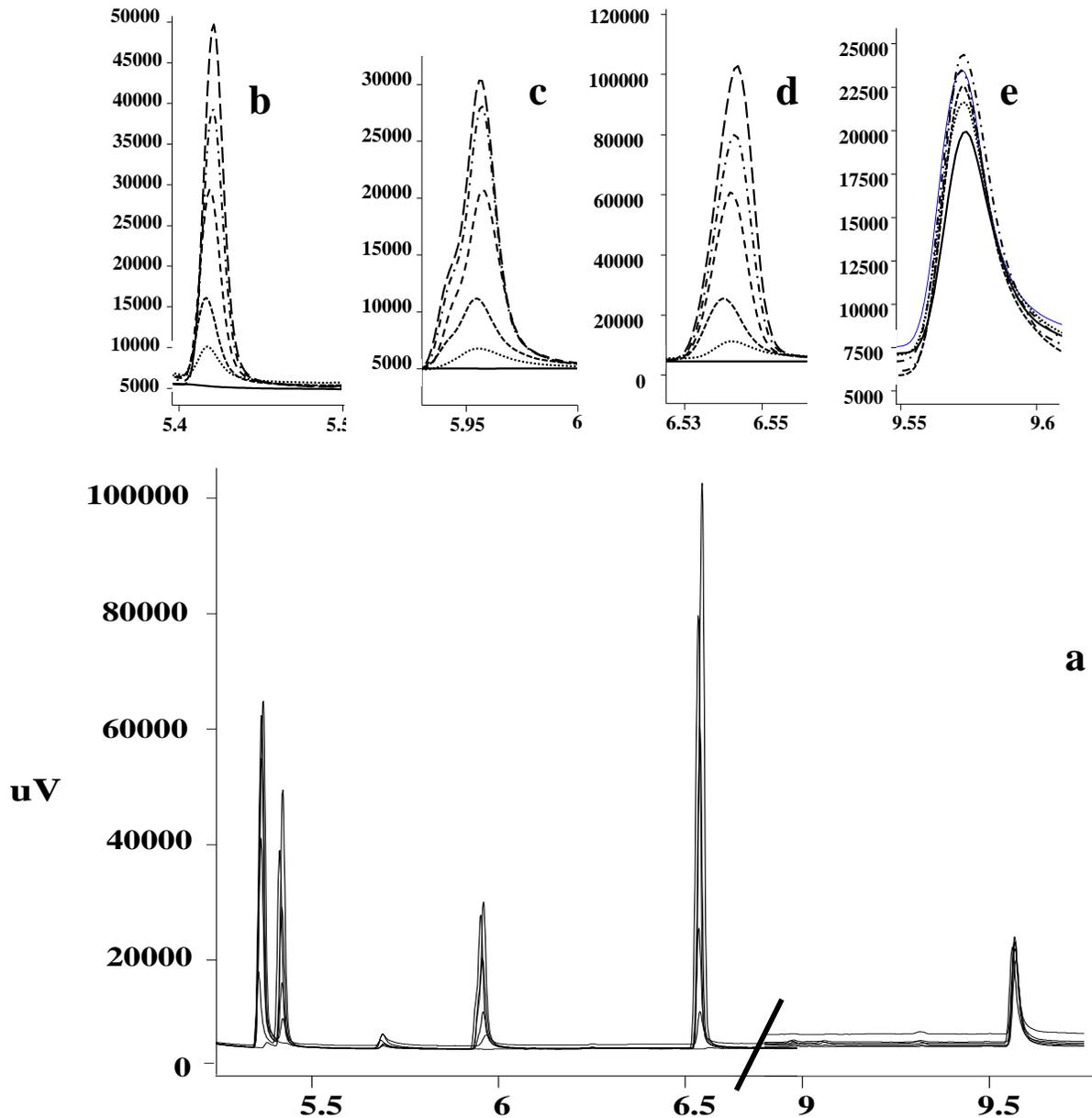


Figura V.8. Cromatogramas correspondientes a) Curva de calibración para el análisis de muestras 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.15 y 0.2 mg/mL de los tres analitos y EI 0.1 mg/mL; b) ampliación de cromatogramas para glioxal c) metilglioxal d) dimetilglioxal y e) fenilglioxal

Los parámetros analíticos evaluados con base en el proceso de calibración se muestran en la Tabla V.3. Los límites de detección para este procedimiento analítico son altos en comparación con otros reportados en la bibliografía para la cuantificación de compuestos dicarbonílicos pequeños en otros equipos instrumentales [81, 109, 110]. Cabe señalar que la señal analítica (Y) fue obtenida dividiendo el área del pico cromatográfico del analito por el área del pico de EI.

Tabla V.3. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-FID

Analito	Ecuación	R ²	LD (mg/L)
Glioxal	Y=1.2911X + 0.0134	0.999	16.0 ± 0.5
Metilglioxal	Y=0.9101X + 0.0642	0.998	34.1 ± 1.0
Dimetilglioxal	Y=3.4206X – 0.4633	0.998	20.7 ± 0.8

Y - $A_{\text{analito}}/A_{\text{EI}}$; X-concentración del analito (G, MG, DMG), mg/mL

El procedimiento GC-FID se utilizó para la determinación de G, MG y DMG en mieles y jarabes, ya que existe evidencia de presencia de estos compuestos en alimentos en relativamente altas concentraciones. Cabe mencionar que este procedimiento, debido a sus altos límites de detección, no fue adecuado para análisis de muestras biológicas.

V.1.4 Cuantificación de G, MG y DMG en mieles y jarabes

El estudio de la presencia de compuestos dicarbonílicos pequeños en alimentos es importante porque brinda información de los procesos de formación de estos, ya sea de manera natural en la materia prima, formados durante elaboración/almacenamiento de los alimentos o agregados como aditivos de color, sabor y conservadores. En el caso de las mieles y jarabes, la presencia de G, MG y DMG puede deberse a cada una de las fuentes que se acaban de mencionar.

En la Figura V.9 se muestran de manera gráfica los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales. En dicho gráfico se presentan solo las mieles en las que hay presencia de alguno o los tres compuestos dicarbonílicos las cuales fueron tres jarabes de agave de alta fructuosa (1- Fake, 2-Damro, y 3- Damro Org) y una correspondiente a un jarabe de maple (4-Mapleorg)

Lo resaltable en estos resultados es que los tres compuestos pueden ser detectados y cuantificados en una sola corrida, ejemplo de esto es la miel Fake del grupo de jarabes de agave de alta fructuosa, que contiene relativamente altas concentraciones de, MG y DMG. Por otro lado, MG

fue encontrado en tres productos en relativamente altas concentraciones; este compuesto puede agregarse a algunos alimentos como saborizante o puede formarse como producto de reacción Maillard u oxidación de glucosa durante proceso de elaboración/almacenamiento; sin embargo, es necesario profundizar más acerca de su origen en este tipo de productos alimenticios.

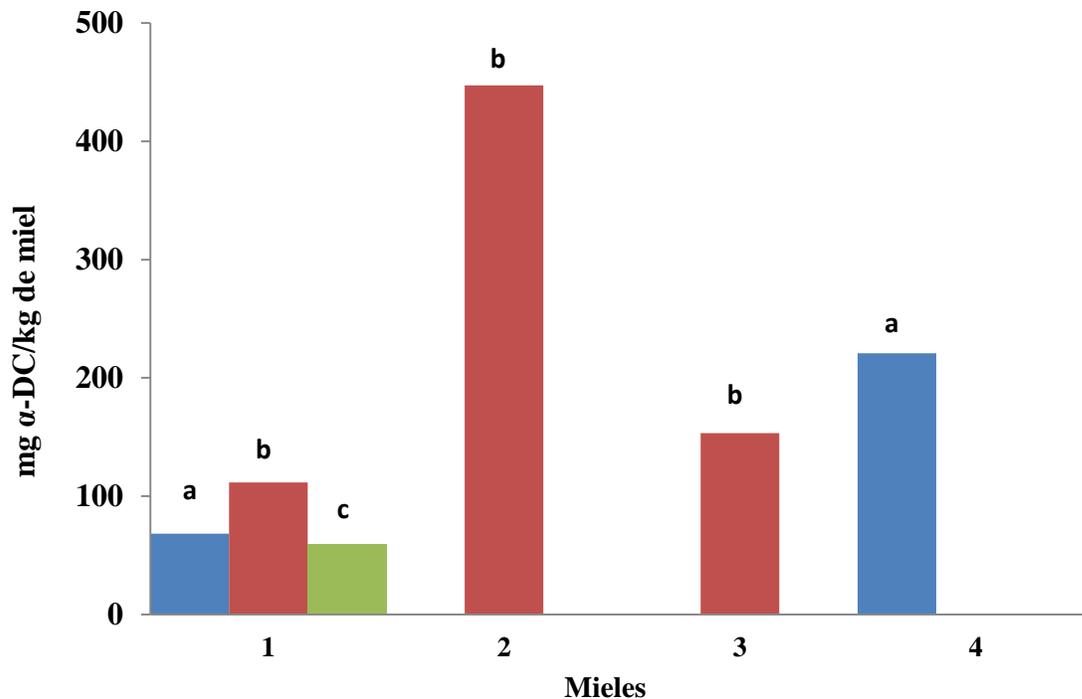


Figura V.9. Resultados de determinación de α -DC determinados en diferentes mieles y jarabes: 1-Fake, 2-Damro, 3-Endolg, 4-Mapleorg. a)Glioxal b)Metilglioxal c) Dietilglioxal

La Tabla V.4 muestra las concentraciones de α -DC con respectivos valores de desviación estándar evaluados con base en tres réplicas del análisis, como se puede observar en la mayoría de las mieles no se detectó presencia de estos compuestos dicarbonílico debido muy bajo poder de detección del procedimiento.

Tabla V.4. Cantidades de G, MG y DMG determinadas por GC-FID utilizando fenilglioxal como SI.

Muestra	mg α -DC/kg miel		
	Glioxal	Metilglioxal	Dimetilglioxal
1)Fake	68.2 \pm 2.05	112 \pm 3	59.6 \pm 1.5
2)Damro	ND	447 \pm 13	ND

3)Endorg	ND	153 ± 3	ND
4)Maple Org	221 ± 6	ND	ND
5)BB caro	ND	ND	ND
6)Endol	ND	ND	ND
7)Jarabe	ND	ND	ND
8)Karo Maple	ND	ND	ND
9)Abeja	ND	ND	ND

Los resultados obtenidos reflejan que utilizando cromatografía de gases con detección por ionización con flama y el procedimiento utilizado no es posible cuantificar a G, MG y DMG a nivel traza en mieles.

V.2 Desarrollo del procedimiento de determinación de glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS(TQ)).

El objetivo principal de esta parte de tesis es la aplicación de la técnica GC-MS(TQ) para la determinación de G, MG y DMG en muestras biológicas, partiendo de las condiciones de derivatización (4MPD) y de separación propuestas en la sección anterior. La novedad consiste en el estudio de las condiciones de detección, enfocándose en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples (MRM) que permite aumentar la relación señal/ruido y, en consecuencia ofrece muy bajos límites de detección/cuantificación.

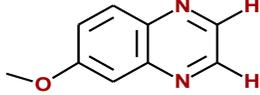
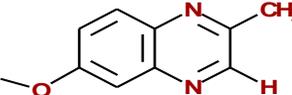
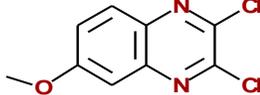
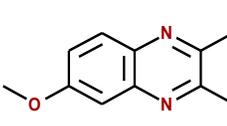
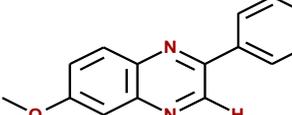
El primer paso para el análisis por GC-MS(TQ) fue la derivatización de los estándares de G, MG y DMG, esto se llevó a cabo con el mismo procedimiento de la **Sección IV.5.3**. Inicialmente se trabajó con una concentración alta de una mezcla de estándares de 0.2 mg/mL (más detallado en **Sección IV.6.2**) con el fin de establecer las condiciones cromatográficas y de ionización/detección. Las condiciones seleccionadas se presentan en la Tabla IV.5.

A continuación se describen los pasos seguidos para poner a punto la metodología analítica que nos permitirá el análisis de manera más específica y sensible para G, MG y DMG.

V.2.1 Análisis de glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal y fenilglioxal por GC-MS(TQ) en modo de barrido completo (FULL SCAN)

Para tener las condiciones más adecuadas para el análisis selectivo de los analitos que nos interesan fue necesario realizar una serie de inyecciones en diferentes modos de trabajo del equipo. En esta parte de trabajo se incluyeron el dietilglioxal y fenilglioxal como posibles estándares internos. El primer modo en el que se trabajó fue el FULL SCAN, o barrido completo, en el cual se obtiene un cromatograma de conteo total de iones (TIC), registrado en un rango de valores 100 a 250 m/z es decir, nos muestra la elución de todos los compuestos que salen de la columna y forman iones con m/z dentro del intervalo seleccionado. La Tabla V.5 muestra los productos esperados de la derivatización de G, MG, DMG, DEG y FG con 4-metoxi-o-fenilendiamina, así como su relación masa carga; con base en estos valores se estableció el intervalo de valores 100 a 250 m/z .

Tabla V.5. Productos esperados de la derivatización de los compuestos dicarbonílicos con 4-metoxi-o-fenilendiamina.

Analito	Producto derivatizado	Relación masa carga (m/z)	Tiempo de retención
Glioxal		160	5.58 ± 0.05
Metilglioxal		174	6.03 ± 0.03
Dimetilglioxal		188	6.5 ± 0.04
Dietilglioxal		216	7.14 ± 0.05
Fenilglioxal		236	8.93 ± 0.01

En la Figura V.10 se muestra un cromatograma obtenidos en modo FULL SCAN, registrado en este intervalo de valores m/z ; se observa presencia de varios picos, entre de los cuales se pudieron identificar los correspondientes a derivados de G, MG, DMG, DEG y FG, con base en espectros de

masa obtenidos para cada uno de los picos y comparación de los m/z de señales abundantes con valores de la Tabla V.6.

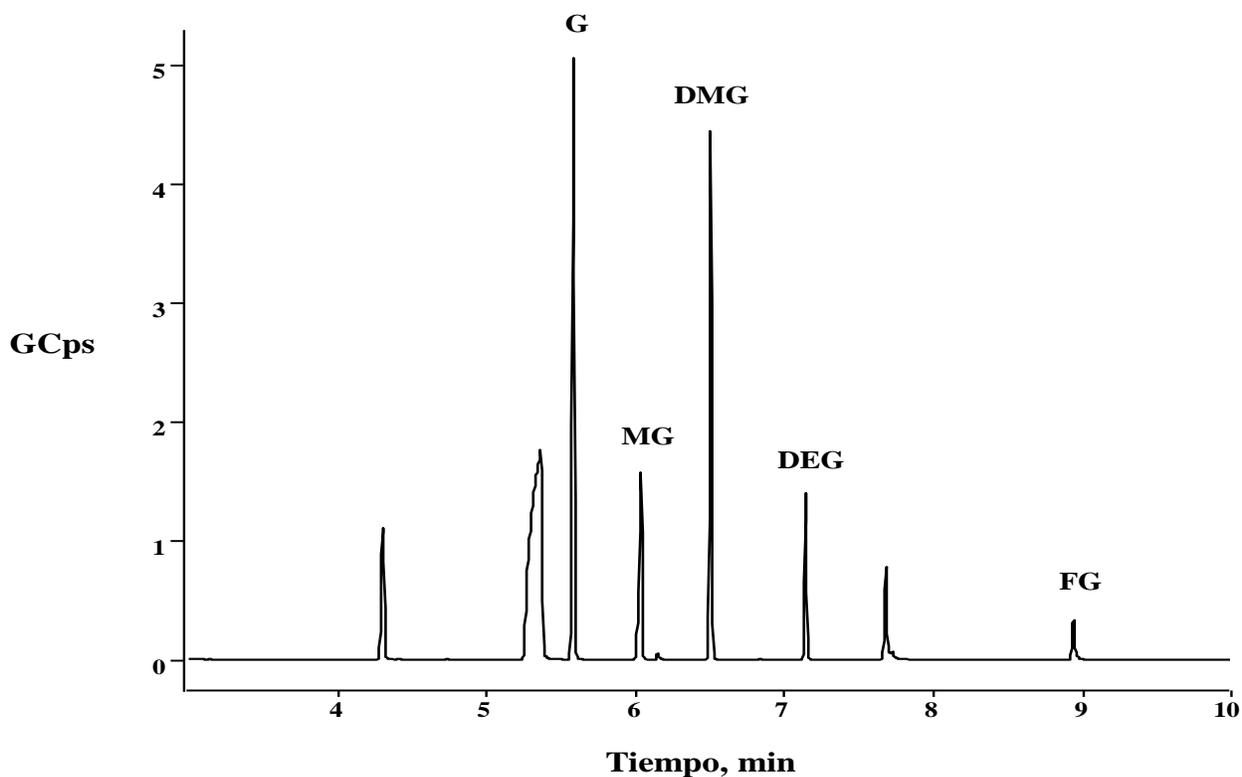


Figura V.10. Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en modo FULL SCAN en GC-MS(TQ). Mezcla de G, MG y DMG [0.2 mg/mL cada uno]; Mezcla DEG y FG [0.1 mg/mL], intervalo m/z 100 - 250.

En la Figuras V.11 – V.15 se muestran los espectros de masas para respectivas metoxiquinoxalinas de glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal, y fenilglioxal. Estos espectros fueron adquiridos en las regiones del cromatograma correspondientes a la elución de cada uno de los compuestos. En los espectros podemos observar que, en cada uno de los casos, el ion más abundante corresponde al ion molecular de derivado α -DC con 4MPD; además en el espectro aparecen iones menos abundantes que son productos de fragmentación y/o impurezas que podrían co-eluirse en el proceso cromatográfico. La Figura V.11 – V.15 a su vez muestran los posibles padrones de fragmentación del ion más abundante (precursor), es decir, las partes de la estructura inicial que al pasar por dispositivo de ionización por impacto de electrones (IE) se forman del rompimiento de la misma.

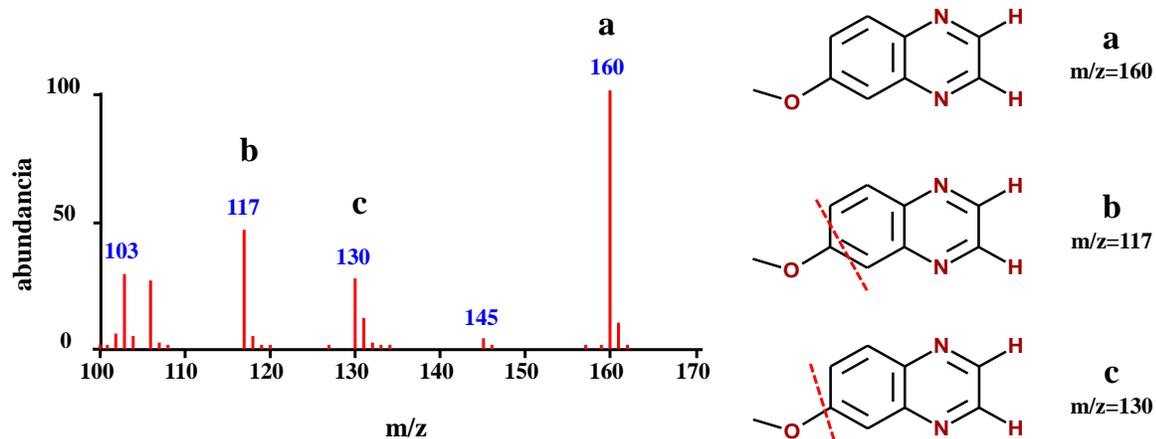


Figura V.11. Espectro de masas para glioxal

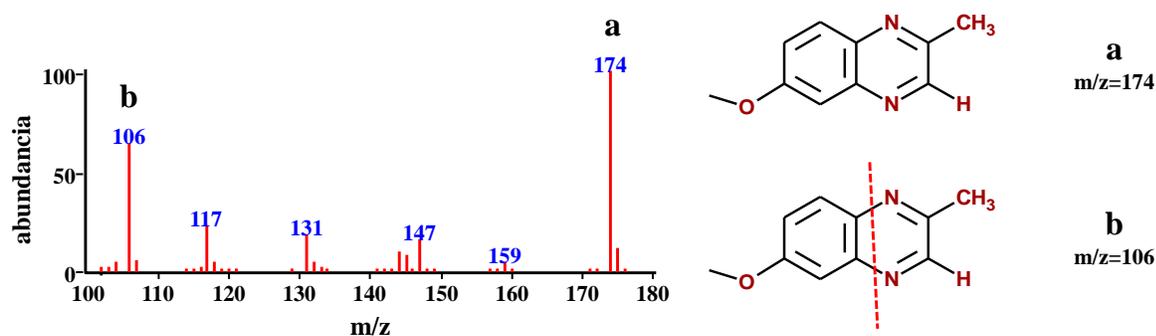


Figura V.12. Espectro de masas para metilglioxal

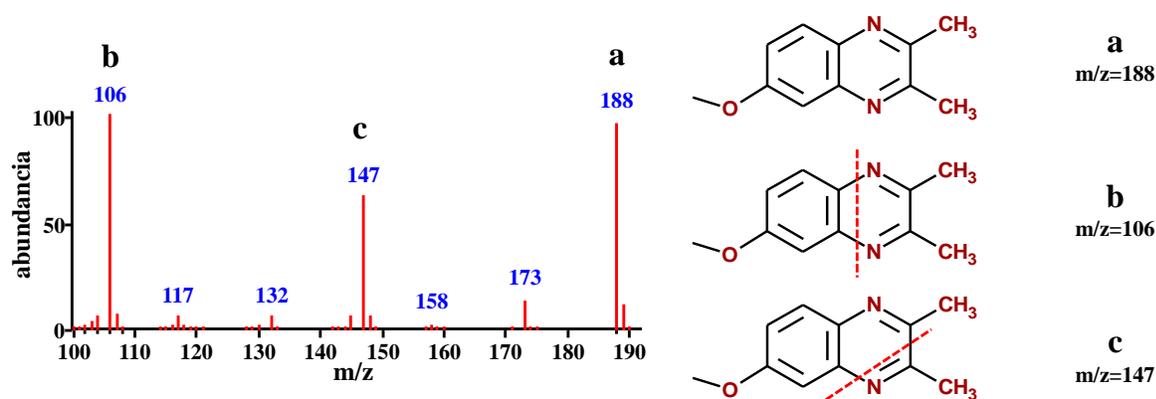


Figura V.13. Espectro de masas para dimetilglioxal

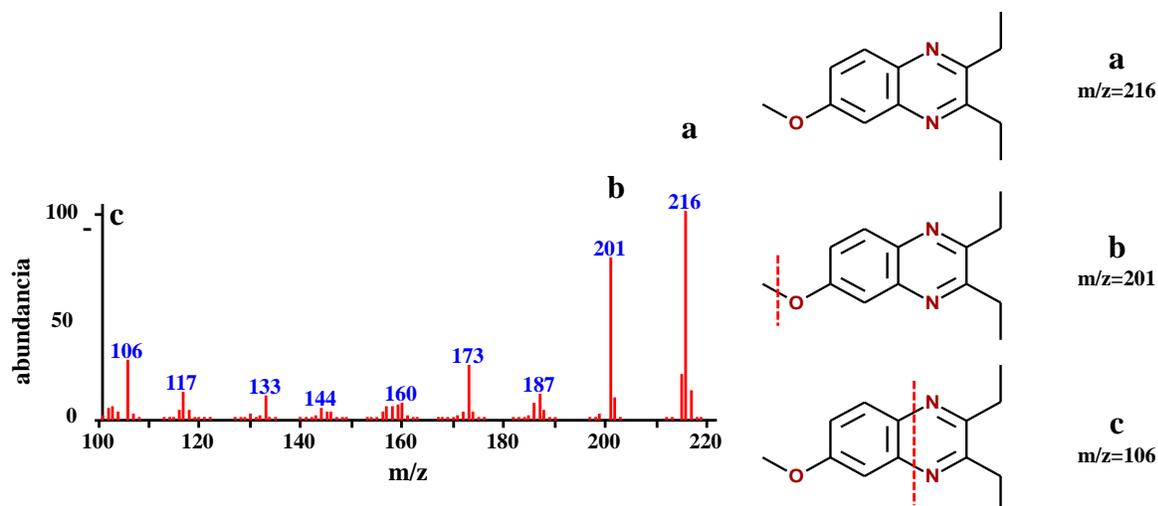


Figura V.14. Espectro de masas para dietilglloxal

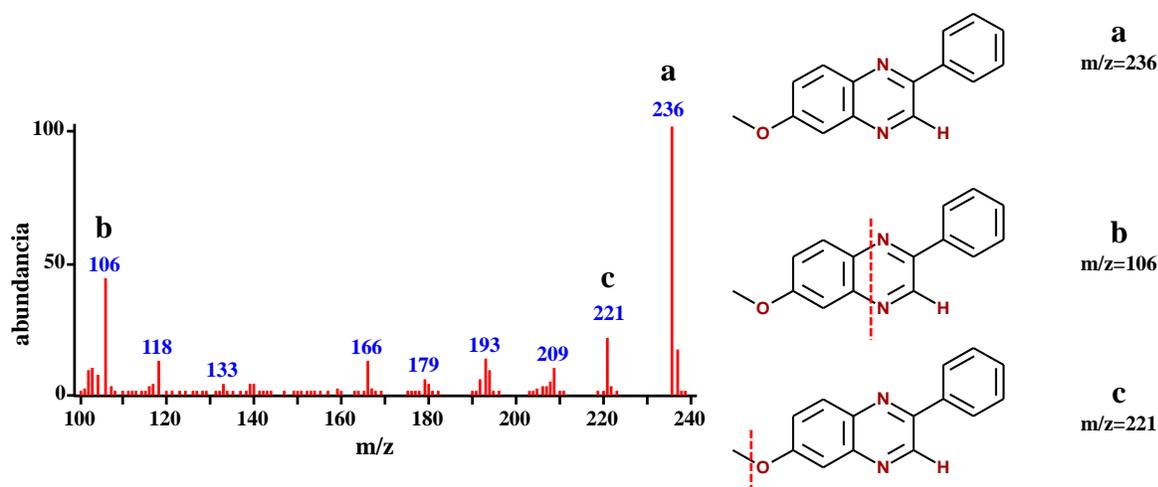


Figura V.15. Espectro de masas para fenilglloxal

Cabe resaltar que esta parte del análisis de los espectros de masas es de suma importancia, ya que permite confirmar/identificar cada uno de los compuestos, así como hallar los iones más abundantes. En concreto, estos espectros ayudan en la asignación de los picos cromatográficos y también permiten pre-seleccionar los iones para la modalidad de adquisición SIM (monitoreo selectivo de iones) y MRM (monitoreo de reacciones múltiples).

V.2.2 Adquisición de cromatogramas GC-MS en el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) para glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal y fenilglioxal

Aunque el modo FULL SCAN nos permitió confirmar la presencia de derivados de G, MG, DMG, DEG y FG y también asignar los picos cromatográficos a la elución de cada uno de estos compuestos, este tipo de detección carece de selectividad y presenta bajo valor S/N. Es por ello que se decidió correr una mezcla de estándares, la cual se diluyó 100 veces, en modo SIM. Esta modalidad de detección consiste básicamente en la extracción del ion más abundante de cada uno de los picos cromatográficos, en este caso 160, 174, 188, 216 y 236 m/z para elución de G, MG, DMG, DEG y FG, respectivamente. En resumen, a partir del TIC se extraen solo aquellos iones que tengan valor masa/carga del ion más abundante para cada soluto, utilizando para cada uno de ellos la ventana de tiempo correspondiente a la elución del compuesto. La Figura V.16 muestra el cromatograma obtenido en modo SIM, podemos observar que el pico de G presenta mayor intensidad respecto a otras señales, de acuerdo con los espectros de masas presentados en las Figuras V.11 – V.15. En particular, relativamente alta abundancia de iones de fragmentación en estos espectros es la causa de que la magnitud de las señales en modo SIM no es muy alta; por otra parte en el modo SIM, la detección de cada compuesto es más selectiva y permite reducir el ruido

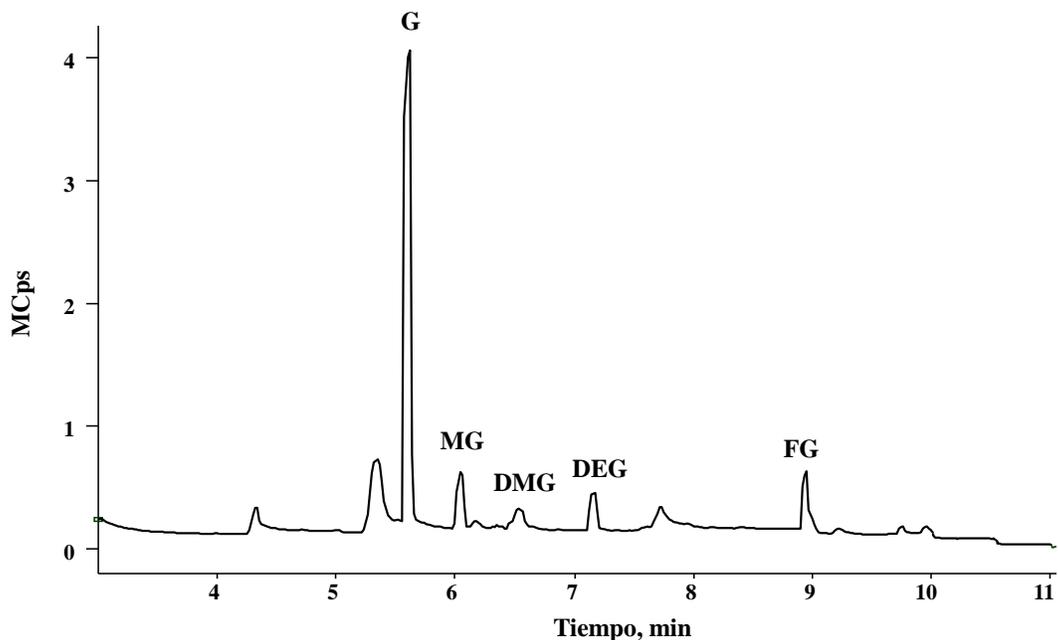


Figura V.16. Cromatograma obtenido en modo SIM; Mezcla de estándares [2 mg/L]; Mezcla DEG y FG [1mg/L]; Iones extraídos: 160, 174, 188, 216 y 236 m/z

En la Tabla V.6 se muestran de manera más condensada los parámetros utilizados en modo SIM donde podemos ver además del tiempo de retención y los iones monitoreados la ventana de tiempo al que se corrió el cromatograma.

Tabla V.6 Tabla de condiciones de trabajo en modo SIM para el monitoreo de iones de G, MG, DMg, DEG y FG.

Compuesto	Tiempo de retención	Ventana de tiempo	m/z monitoreados en SIM
Glioxal	5.58 ± 0.05	4.00-6.00	160
Metilglioxal	6.03 ± 0.03	6.00-6.40	174
Dimetilglioxal	6.5 ± 0.04	6.5-7.00	188
Dietilglioxal	7.14 ± 0.05	7.00-8.00	216
Fenilglioxal	8.93 ± 0.01	8.00-9.30	236

En la Tabla V.7 se presentan los valores señal/ruido (S/N) evaluados para las concentraciones 2 mg/L G, MG, DMG y 1 mg/L DEG, FG en modo SIM, estos valores son bajos lo que nos indica que la pérdida de intensidad de la señal (debido a la fragmentación del ion molecular durante la ionización EI) tiene mayor importancia que la eliminación del ruido, y que este tipo de detección, aunque es selectivo, no permite obtener bajos límites de detección/cuantificación y por ello no es adecuado para el análisis de trazas de los compuestos de interés.

Tabla V.7. Relaciones Señal/Ruido (S/N) de los picos del cromatograma en modo SIM de cada uno de los picos de los analitos.

Analito	S/N modo SIM
Glioxal	378
Metilglioxal	38
Dimetilglioxal	26
Dietilglioxal	52
Fenilglioxal	90

V.2.3 Selección de condiciones para la adquisición de datos en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples

Con el objetivo de hacer un procedimiento que permita la cuantificación de trazas de compuestos dicarbonílicos, se estudiaron las condiciones MRM seleccionando las parejas ion

precursor e ion producto (producto de fragmentación en la zona CID) que aseguren el mayor posible valor S/N. Cabe señalar que, al utilizar el detector del tipo triple cuadrupolo en modo SIM, se selecciona un solo ion abundante (para cada uno de los compuestos) que en muchos casos corresponde al ion molecular y este ion es filtrado por los cuadrupolos subsecuentes, lo que no asegura alta selectividad (aunque dicha selectividad es mejor que en el modo FULL SCAN). Al contrario, en el modo MRM el primer cuadrupolo sirve para seleccionar el(los) ion(es) precursor(es) formados por la ionización IE, mientras que el segundo cuadrupolo funciona como zona CID (cámara de fragmentación de iones inducida por colisiones) y en el tercer cuadrupolo se pueden filtrar y monitorear selectivamente los iones productos. De esta manera en el modo MRM se llevan a cabo dos pasos de fragmentación (IE, CID) y cada cuadrupolo tiene función diferente lo que conduce al aumento de selectividad hacia el compuesto de interés y, lo que es más importante permite disminución importante del ruido. Se puede seleccionar la energía de colisiones (EC) en la zona CID, con el fin de obtener alta abundancia de ion producto de interés, llegándose a altos valores S/N y, como consecuencia se pueden cuantificar los compuestos presentes en la muestra a nivel de ultratrazas.

Lo que se hizo en esta parte del desarrollo metodológico, fue ir examinando diferentes valores de energía de colisión (EC) en la cámara CID para cada uno de los analitos, bajo el criterio de obtener iones precursores y iones producto específicos para cada uno de los compuestos y buscando que los iones producto presenten abundancia relativamente alta. Es importante que, en nuestro análisis cromatográfico se obtuvo la separación de los compuestos de interés, por lo que el estudio de la energía EC se pudo llevar a de manera individual para cada uno de ellos.

Se examinaron diferentes energías de colisión, iniciando con valores iguales para los 5 analitos, adquiriendo los datos en la modalidad PRODUCT. En este caso, se hace entrar a la zona CID todos los iones obtenidos en la ionización por impacto de electrones (EI) (Figuras V.11 – V.15) y se registran espectros de masa que incluyen todos los productos de ionización CID. Los resultados obtenidos sirven para elegir parejas de iones precursor-producto que se utilizan en la detección MRM y donde el ion producto tenga la intensidad más alta posible. De manera de ejemplo, en la Figura V.17 se muestran los espectros de masas obtenidos en el modo PRODUCT para cada uno de los compuestos empleando 10eV y 30eV de energía de colisión en la zona CID. Se observa que 10 eV es una energía demasiado baja ya que no permite fragmentación efectiva de iones precursores,

mientras que al aplicar 30 eV en la zona CID, se obtienen varios fragmentos sin que se pueda elegir uno de relativamente alta abundancia.

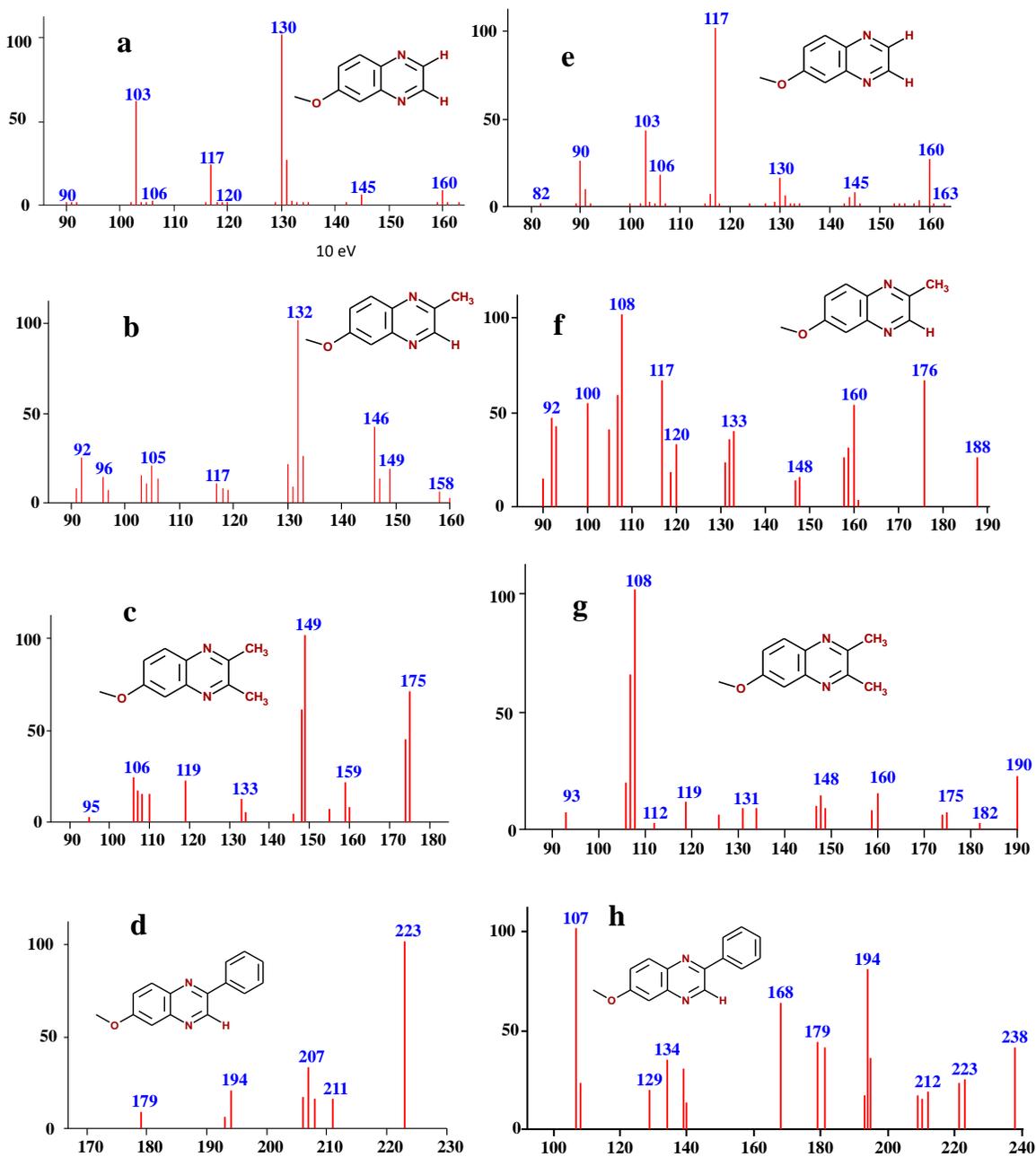


Figura V.17. Espectros de masas obtenidos en la fragmentación de iones precursoros en la zona CID, empleando energía 10 eV y 30 eV. a)G (10 eV) b)MG(10 eV) c)DMG (10eV) d) FG (10 eV) e) G (30 eV) f)MG(30 eV) g)DMG(30 eV) h)FG(30 eV)

Con base en estos resultados, se examinaron diferentes valores de energía de colisión en el intervalo 10-30 eV, bajo el criterio de obtener para cada uno de los compuestos un ion de fragmentación (ion producto) que tenga más alta abundancia relativa. En la Tabla V.7 se muestran de manera comparativa las condiciones de detección para el modo SIM y modo MRM. En primer caso, los iones elegidos fueron los más abundantes en la ionización por impacto de electrones EI (iones moleculares). Por su parte, para MRM se muestran energías empleadas en zona CID para cada uno de los compuestos y las transiciones ion precursor → ion producto seleccionadas con base en los experimentos que se acaban de describir.

Tabla V.8. Valores m/z utilizados en el modo SIM y en el modo MRM, incluyendo transiciones ion precursor → ion producto junto con valores de energía empleada en la zona CID para glioxal, metilglioxal, dimetilglioxal, dietilglioxal y fenilglioxal.

Analito	SIM	MRM	
	m/z del ión más abundante	m/z precursor → producto	Energía zona CID
Glioxal	160	160 → 117	26 eV
Metilglioxal	174	174 → 106	28 eV
Dimetilglioxal	188	188 → 106	21 eV
Dietilglioxal	216	216 → 201	21 eV
Fenilglioxal	236	236 → 221	18 eV

La Figura V.18 muestra el cromatograma en MRM ya con todos los parámetros elegidos, donde se presentan solamente cinco picos, correspondientes a la elución de derivados de G, MG, DMG, DEG y FG. Asimismo, la línea base es mucho más baja respecto al cromatograma SIM (Fig. V.16)

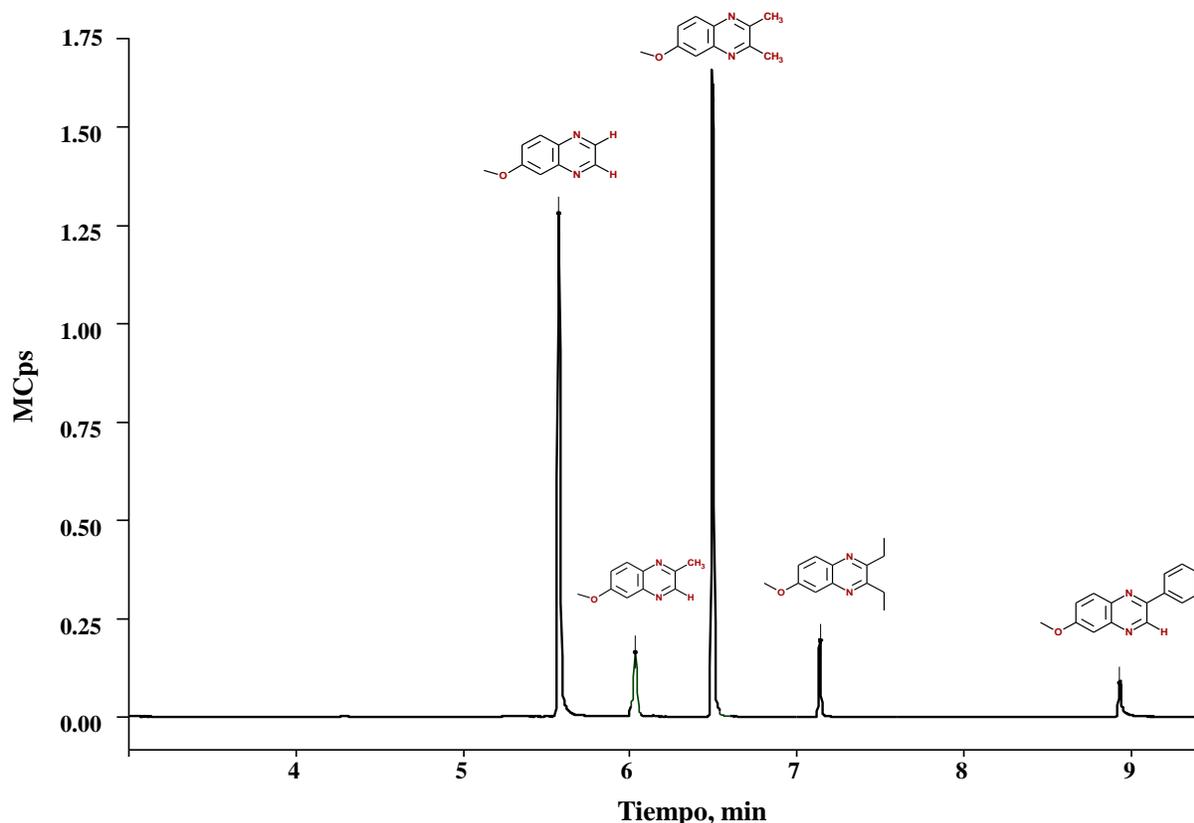


Figura V.18. Cromatograma obtenido en Modo MRM: Glioxal 160→117(26 eV); Metilglioxal 174 →106(28eV); Dimetilglioxal 188→106(21eV); Dietilglioxal 216→201(21eV); Fenilglioxal 236→221 (18eV). Mezcla de estándares 2 mg/L cada uno y DEG, FG 1mg/L cada uno.

Con base en este cromatograma, se obtuvieron valores S/N para cada uno de los picos/compuestos, mismos que se presentan en Tabla V.8. Cabe mencionar que los cromatogramas SIM y MRM (Figuras V.16 y V.18) fueron obtenidos para las mismas soluciones mixtas de estándares y que, de acuerdo con lo esperado, los valores S/N en el modo MRM fueron mucho más altos respecto modo SIM (Tablas V.6 y V.8). Es también importante resaltar que estos altos valores S/N en el modo MRM se deben a la eliminación del ruido y no al aumento de la intensidad de la señales, ya que la cantidad de iones producto siempre corresponde solamente a una fracción de la cantidad de iones precursor.

Tabla V.8. Relaciones Señal/Ruido de los picos del cromatograma en modo MRM de cada uno de los picos de los analitos.

Analito	S/N modo MRM
Glioxal	7284
Metilglioxal	741

Dimetilglioxal	9459
Dietilglioxal	2186
Fenilglioxal	1116

V.2.4 Proceso de calibración en el procedimiento GC-MS(TQ) en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples

Tal como se indica en la parte experimental (**Sección IV.6.3**), se preparó la solución mixta de los estándares conteniendo 25 μM cada uno de ellos (correspondientes a 1.45 mg/L G,... 1.90 mg/L MG y 2.15 mg/L DMG); asimismo se preparó una solución 50 μM DEG como estándar interno (5.71 mg/L). Cabe mencionar que se decidió utilizar al dietilglioxal como estándar interno, ya que éste presentó un menor tiempo de retención que el fenilglioxal y también la mayor magnitud de la señal. A partir de estas soluciones se hizo diluciones correspondientes para obtener las soluciones de calibración conteniendo 0, 0.5, 1.0, 1.5, y 2 μM de cada uno de los analitos y 10 μM de EI. Se obtuvieron cromatogramas en la modalidad MRM, mismos que se presentan en la Figura V.19 .

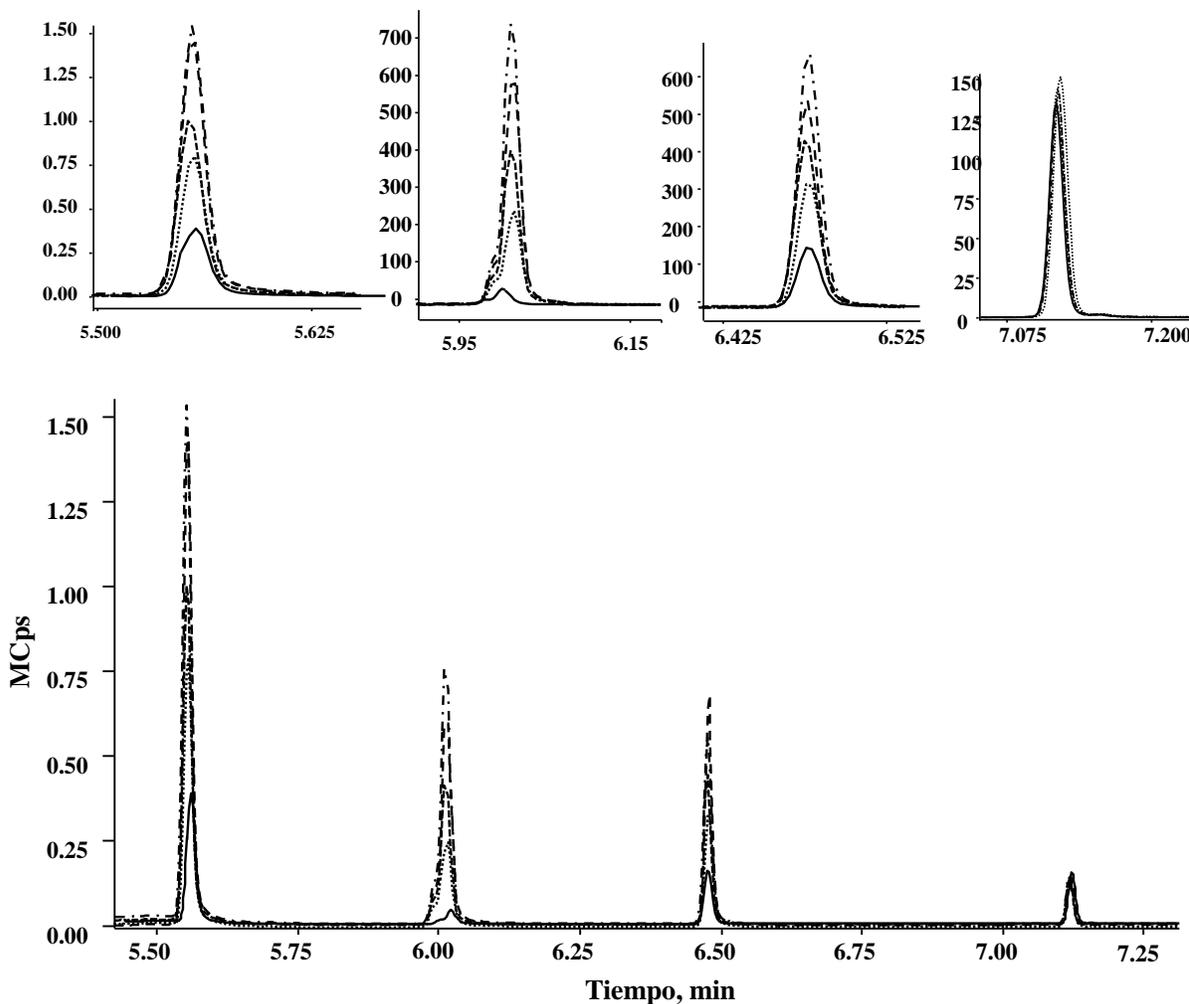


Figura V.19. Curva de calibración den GC-MS(TQ) en modo MRM: glioxal 160→117(26 eV); metilglioxal 174 →106(28eV); dimetilglioxal 188→106(21eV); dietilglioxal 216→201(21eV). ; Concentraciones: 0, 0.5, 1, 1.5, 2 μ M de cada uno de los analitos y ¿?? μ M del EI (DEG).

Los parámetros obtenidos en el proceso de calibración se muestran en la Tabla V.9 donde además de las ecuaciones de regresión lineal para cada uno de los compuestos, se incluyen el coeficiente de regresión lineal (R^2) y el límite de detección evaluado con base en la relación $S/N = 3$. Se presenta el valor promedio de LD con su respectivo DE, obtenidos midiendo la señal del más bajo estándar de calibración en tres diferentes días.

Tabla V.9. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración mediante GC-MS(TQ) en modo MRM utilizando DEG como estándar interno

Analito	Ecuación	R ²	LD (nM)	LD (ng/L)
Glioxal	Y = 51.8 X + 3.5	0.999	0.49 ± 0.01	29 ± 0.8
Metilglioxal	Y = 32.9 X + 0.7	0.997	0.33 ± 0.01	29 ± 0.6
Dimetilglioxal	Y = 103 X - 4.5	0.998	(6.3 ± 0.1) × 10 ⁻²	7 ± 0.1

Y – señal analítica definida como radio entre área del pico de cada uno de los analitos y el área de pico del EI; X- concentración del analito, µM.

Los límites de detección son del orden de ng/L (nanogramos por litro) en este caso lo que comparado con otras metodologías de detección para G, MG y DMG son límites muy bajos (Ver Tabla I.1).

V.2.5 Análisis de muestras biológicas en GC-MS(TQ) en modo MRM

Se analizaron muestras biológicas (orina) que se describen detalladamente en la parte experimental (Sección IV??). En esta misma sección se describe también el procedimiento de tratamiento de muestras y de derivatización con 4MPD, ambos adoptados del estudio anterior [73]. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla V.10., donde los pacientes del “Grupo P” son sujetos sanos, los del “Grupo DS” son pacientes diabéticos sin complicaciones y finalmente el “Grupo DC” corresponde a los pacientes diabéticos con complicaciones avanzadas.

Tabla V.10. Resultados de determinación de G, MG, DMG en orina obtenidos para tres grupos diferentes de pacientes mediante el procedimiento GC-MS(TQ) en el modo MRM. Se presentan valores promedio con sus respectivos De, obtenidos con base en tres réplicas independientes.

Paciente	Glioxal ± DE, µM		Metilglioxal ± DE, µM		Dimetilglioxal ± DE, µM	
	individual	promedio	individual	promedio	individual	promedio
P1	2.98 ± 0.16	3.03 ± 0.53	2.87 ± 0.46	2.88 ± 0.33	5.28 ± 1.12	6.19 ± 0.7
P2	2.38 ± 0.99		2.08 ± 0.32		4.70 ± 0.04	
P3	3.83 ± 0.52		2.96 ± 0.26		8.27 ± 1.39	
P4	2.58 ± 0.22		2.95 ± 0.03		5.44 ± 0.42	
P5	3.36 ± 0.77		3.56 ± 0.58		7.24 ± 0.47	
DS1	3.25 ± 0.47	4.08 ± 1.01	2.77 ± 0.28	3.31 ± 0.31	11.93 ± 1.14	10.26 ± 0.92
DS2	4.82 ± 0.51		4.26 ± 0.22		9.21 ± 0.12	
DS3	3.30 ± 1.48		2.48 ± 0.59		14.74 ± 1.67	
DS4	4.88 ± 1.92		3.37 ± 0.24		6.42 ± 0.52	
DS5	4.16 ± 0.68		3.66 ± 0.20		9.00 ± 1.17	

DC1	1.51 ± 0.53	3.28 ± 0.48	1.82 ± 0.50	3.04 ± 0.32	7.26 ± 1.25	7.57 ± 0.81
DC2	7.54 ± 1.18		4.77 ± 0.11		7.72 ± 0.86	
DC3	2.62 ± 0.12		2.14 ± 0.28		8.23 ± 0.54	
DC4	2.92 ± 0.34		4.87 ± 0.59		8.03 ± 0.86	
DC5	1.76 ± 0.25		2.15 ± 0.13		6.61 ± 0.56	

En primer lugar, los resultados obtenidos están dentro de los intervalos reportados previamente en estudios anteriores [23, 73], lo que confirma la utilidad del procedimiento desarrollado para la determinación de concentraciones fisiológicas de compuestos dicarbonílicos en orina. En particular, Akira et. all [23] reportó niveles de glioxal en orina de hasta 250 μM , y de metilglioxal de hasta 100 μM en pacientes sanos. Mientras que Espinosa-Mancilla[101], reportó niveles de 13.10 μM , 1.5 μM y 2.10 μM , para G, MG y DMG respectivamente, en muestras de orina(de origen no especificado).

Por otro lado, en la Tabla V.10 se observa una tendencia hacia mayores concentraciones de G, MG y DMG en pacientes diabéticos respecto a las personas sanas; sin embargo a estos resultados no se puede dar una interpretación de relevancia biomédica. Como ya se comentó en la introducción, presencia de estos compuestos en el organismos (y en orina) depende de factores endógenos y exógenos, siendo el estilo de vida de cada persona, el tipo de alimentación y el estrés oxidativo los factores importantes. Ejemplo de esto es que Ojeda et. all [73] reporta niveles de G, MG y DMG en jóvenes nadadores los cuales son comparables con los niveles encontrados en pacientes diabéticos. Por otro lado, y lejos de formular conclusiones contundentes acerca de papel de compuestos dicarbonílicos en humanos, los resultados presentados en la Tabla V.10 confirman que el procedimiento desarrollado en este trabajo puede ser utilizado en la determinación de estos compuestos.

VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis abordó principalmente el desarrollo de la metodología analítica que nos permitiera la cuantificación de tres compuestos α -dicarbonílicos los cuales fueron glioxal, metilglioxal y dimetilglioxal. Las técnicas analíticas seleccionadas para este fin fueron cromatografía de gases con detector FID y en acoplamiento con espectrometría de masas.

La principal dificultad con la que nos encontramos en este trabajo fue relacionada con el carácter ubicuo de estos compuestos, su alta reactividad, volatilidad, necesidad de su derivatización pre-columna y el requerimiento de utilizar un estándar interno.

En cuanto al estándar interno, inicialmente se consideró dimetilglioxal; sin embargo al encontrar este compuestos en diferentes tipos de muestras reales, se probaron el dietilglioxal y fenilglioxal. Con base en los estudios sistemáticos, se optó por DEG ya que este permitió más corto tiempo de separación cromatográfica y mayor sensibilidad respecto al FG.

Para la etapa de derivatización pre-columna, se estudiaron 1,2-diaminopropano y 4MPD, seleccionando el segundo con base en un mejor comportamiento cromatográfico de los compuestos derivados.

El sistema GC-FID fue utilizado para el estudio de las condiciones de separación cromatográfica obteniendo la resolución de G, MG, DMG en 10 min, pero baja sensibilidad de la detección no permitió aplicación del procedimiento al análisis de muestras biológicas. Los límites de detección de G, MG y DMG fueron en el intervalo 16-34 mg/L. En el análisis de una serie de mieles y jarabes, se logró la cuantificación de los tres compuestos en una sola muestra, MG fue encontrado y cuantificado en tres muestras, pero en el resto de productos no se logró detectar ninguno de los tres compuestos.

El sistema GC-MS(RQ) fue utilizado para lograr la cuantificación de G, MG, DMG en muestras biológicas (orina) donde las concentraciones reportadas anteriormente fueron del orden de microgramos por litro. Para lograr bajos límites de detección, se establecieron las condiciones de detección/cuantificación en la modalidad de monitoreo de reacciones múltiples. Se seleccionó la energía de colisión en la zona CID y se establecieron valores m/z para transiciones ion precursor \rightarrow ion producto para cada uno de los compuestos, logrando disminuir de manera drástica el ruido y aumentar los valores S/N respecto al análisis realizado mediante monitoreo selectivo de iones (SIM).

En consecuencia, los límites de detección evaluados para G, MG, DMG en el modo MRM fueron en el intervalo 7 – 29 ng/L, lo que significa seis órdenes de magnitud más bajos respecto a los evaluados en el procedimiento GC-FID.

Otra ventaja que nos brindó GC-MS(TQ) en la modalidad MRM es que debido a la extraordinaria selectividad, no fue necesaria la purificación del reactivo de derivatización. En particular, al emplear método HPLC-FLD desarrollado previamente, el paso de purificación del 4MPD fue muy importante ya que este reactivo contiene bajas concentraciones de compuestos fluorescentes que afectaban la detección de los compuestos de interés [73], mientras que empleando las transiciones ion precursor → ion producto en la detección por MS(TQ) no se presentaba ningún tipo de interferencias. Cabe sin embargo señalar que los reactivos tenían que ser purificados para eliminar α -DC.

VII. REFERENCIAS

1. Xu, B., et al., *Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products*. *Faseb J*, 2003. **17**(10): p. 1289-91.
2. Rudeman, N., J. Williamson, and M. Brownlee, *Glucose and diabetes vascular disease*. *Faseb J*, 1992. **6**: p. 2905-2914.
3. Mendez, J.D., *AGEs and chronic complications of diabetes mellitus*. *Gac Med Mex*, 2003. **139**: p. 49-55.
4. Miura, J., et al., *Serum levels of non-carboxymethyllysine advanced glycation endproducts are correlated to severity of microvascular complications in patients with Type 1 diabetes*. *J Diabetes Complications*, 2003. **17**(1): p. 16-21.
5. Bucala, R. and H. Vlassara, *Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease*. *Am J Kidney Dis*, 1995. **26**(6): p. 875-88.
6. Cohen, M.P. and F.N. Ziyadeh, *Role of Amadori-modified nonenzymatically glycated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(2): p. 183-90.
7. Daimon, M., et al., *Increased serum levels of pentosidine, but not carboxymethyl lysine, in type 2 diabetes without obvious diabetic nephropathy*. *Diabetes Care*, 1999. **22**(5): p. 877-8.
8. Dominguez, J.H., et al., *Studies of renal injury III: lipid-induced nephropathy in type II diabetes*. *Kidney Int*, 2000. **57**(1): p. 92-104.
9. Friedman, E.A., *Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications*. *Diabetes Care*, 1999. **22 Suppl 2**: p. B65-71.
10. Kalousova, M., et al., *Advanced glycation end products in clinical nephrology*. *Kidney Blood Press Res*, 2004. **27**(1): p. 18-28.
11. Endo, M., et al., *Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy*. *Horm Metab Res*, 2001. **33**(5): p. 317-22.
12. Hirata, K. and K. Kubo, *Relationship between Blood Levels of N-Carboxymethyl-lysine and Pentosidine and the Severity of Microangiopathy in Type 2 Diabetes*. *Endocr J*, 2004. **51**(6): p. 537-44.
13. Karachalias, N., et al., *Accumulation of fructosyl-lysine and advanced glycation end products in the kidney, retina and peripheral nerve of streptozotocin-induced diabetic rats*. *Biochem Soc Trans*, 2003. **31**(Pt 6): p. 1423-5.
14. Singh, R., et al., *Advanced glycation end-products: a review*. *Diabetologia*, 2001. **44**(2): p. 129-46.
15. Turk, Z., R. Mesic, and B. Benko, *Comparison of advanced glycation endproducts on haemoglobin (Hb-AGE) and haemoglobin A1c for the assessment of diabetic control*. *Clin Chim Acta*, 1998. **277**(2): p. 159-70.
16. Vlassara, H., M. Brownlee, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation: role in the pathogenesis of diabetic complications*. *Clin Chem*, 1986. **32**(10 Suppl): p. B37-41.
17. Urata, Y., et al., *Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW264.7 mouse macrophages*. *Free Radic Biol Med*, 2002. **32**(8): p. 688-701.
18. Lalla, E., et al., *Receptor for advanced glycation end products, inflammation, and accelerated periodontal disease in diabetes: mechanisms and insights into therapeutic modalities*. *Ann Periodontol*, 2001. **6**(1): p. 113-8.

19. Wrobel, K., et al., *Effect of Chromium on Glucose Tolerance, Serum Cholesterol and Triglyceride Levels in Occupational Exposure to Trivalent Species, in Type 2 Diabetic Patients and in Control Subjects*. *Tr Elem Electrol*, 1999. **16**: p. 199-205.
 20. Tietz.
 21. Bastaa, G., A.M. Schmidt, and R.D. Caterina, *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes*. *Cardiovascular Research* 2004. **63**: p. 582– 592
 22. Miyata, T., et al., *Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications*. *Kidney Int*, 1999 **55**: p. 389-399.
 23. Akira, K., Y. Matsumoto, and T. Hashimoto, *Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography*. *Clin Chem Lab Med.*, 2004. **42**: p. 147.
 24. Nemet, I.F., et al., *Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography*. *Clin. Biochem*, 2004. **37**: p. 875.
 25. Freire, A.P., et al., *Anti-glycation defences in yeast*. *Biochem Soc Trans.*, 2003. **31**: p. 1409.
 26. Kuhla B Fau - Haase, C., et al., *Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation*. *J Biol Chem.*, 2007 **282**(0021-9258 (Print)): p. 6984.
 27. García, J.R., *Estudio de Diferentes Marcadores de Glicación en las Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus*. Universidad de Santiago de Compostela (Tesis Doctoral)
- 2009.
28. Thornalley, P.J., A. Langborn, and H.S. Minhas, *Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3 deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose*. *Biochem. J.* , 1999. **344**: p. 109-116.
 29. Bügel, W.P.V.H.B.D.C.S., *Advanced glycation endproducts in food and their effects on health*. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **60**: p. 10-37.
 30. Brownlee M Fau - Vlassara, H., A. Vlassara H Fau - Cerami, and A. Cerami, *Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications*. *Ann Intern Med.*, 1984. **101**(0003-4819 (Print)): p. 527-537.
 31. Dyer Dg Fau - Dunn, J.A., et al., *Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging*. *J Clin Invest.*, 1993(0021-9738 (Print)): p. 2463-2469.
 32. McCance Dr Fau - Dyer, D.G., et al., *Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. *J Clin Invest.*, 1993. **91**(0021-9738 (Print)): p. 2470-2478.
 33. Vlassara H Fau - Fuh, H., et al., *Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complications*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1992. **89**(0027-8424 (Print)): p. 12043.
 34. Horiuchi, S., *Advanced Glycation End Products (AGE)-Modified Proteins and Their Potential Relevance to Atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 1996. **6**(1050-1738 (Print)): p. 163.
 35. Sell Dr Fau - Lane, M.A., et al., *Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1996. **90**(0027-8424 (Print)): p. 485-490.
 36. Kasper, M. and R.H.W. Funk, *Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs)*. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 2001. **32** p. 233–243.
 37. Min, J.Z., et al., *Rapid and sensitive determination of the intermediates of advanced glycation end products in the human nail by ultra-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry*. *Analytical Biochemistry*, 2012. **424**: p. 187–194.

38. Cerami, C., et al., *Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products.* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1997: p. 13915–13920.
39. Zhang, Q., et al., *A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease.* Journal of Proteome Research, 2009. **8**: p. 754-769.
40. Yanga, K., et al., *Differences in glyoxal and methylglyoxal metabolism determine cellular susceptibility to protein carbonylation and cytotoxicity.* Chemo-Biological Interactions 2011. **191**: p. 322–329.
41. Loidl-Stahlhofen, A. and G. Spiteller, *alpha-Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation.* Biochim Biophys Acta., 1994. **1211**: p. 156-160.
42. Wells-Knecht, K., et al., *Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose.* Biochemistry, 1995. **34**: p. 3702-3709.
43. Glomb, M. and V. Monnier, *Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction.* J Biol Chem., 1995. **270**: p. 10017-10026.
44. Casazza, J., M. Felver, and R. Veech, *The metabolism of acetone in rat.* J Biol Chem. , 1984. **259**: p. 231-236.
45. Lyles, G. and J. Chalmers, *The metabolism of aminoacetone to methylglyoxal by semicarbazide-sensitive amine oxidase in human umbilical artery.* Biochem Pharmacol, 1992. **43**: p. 1409–1414.
46. Han, Y., et al., *Plasma methylglyoxal and glyoxal are elevated and related to early membrane alteration in young, complication-free patients with Type 1 diabetes.* Mol Cell Biochem, 2007. **305**(1-2): p. 123-31.
47. Sejersen, H. and S.I. Rattan, *Dicarbonyl-induced accelerated aging in vitro in human skin fibroblasts.* Biogerontology, 2009. **10**(2): p. 203-11.
48. Chaplen, F.W.R., W.E. Fahl, and D.C. Cameron, *Detection of Methylglyoxal as a Degradation Product of DNA and Nucleic Acid Components Treated with Strong Acid.* Anal Biochem, 1996. **236**: p. 262–269.
49. Cordeiro, C. and A.P. Freire, *Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent.* Anal Biochem, 1996. **234**: p. 221-224.
50. Kumar, M.S., et al., *Effect of dicarbonyl-induced browning on alpha-crystallin chaperone-like activity: physiological significance and caveats of in vitro aggregation assays.* Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 273-82.
51. Nakayama, K., et al., *Plasma alpha-oxoaldehyde levels in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease patients.* Am J Nephrol, 2008. **28**(6): p. 871-8.
52. Cantero, A.V., et al., *Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis.* FASEB J, 2007. **21**(12): p. 3096-106.
53. Rabbani, N. and P.J. Thornalley, *Glyoxalase in diabetes, obesity and related disorders.* Sem Cell & Develop Biol 2011. **22**: p. 309-317.
54. Zatterale, A., et al., *Oxidative stress biomarkers in four Bloom syndrome (BS) patients and in their parents suggest in vivo redox abnormalities in BS phenotype.* Clin Biochem, 2007. **40**(15): p. 1100-3.
55. Höhn, A., J. König, and T. Grune, *Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins.* Journal of proteomic, 2013. **92**: p. 132-159.
56. Baynes, J.W., *Role of oxidative stress in development of complications in diabetes.* Diabetes, 1991. **40**(0012-1797 (Print)): p. 405-412.

57. Poulsen, W., et al., *Advanced glycation endproducts in food and their effects on health*. Food and Chemical Toxicology, 2013. **60**: p. 10-37.
58. Rosário, P.M.Á.d., et al., *Analysis of methylglyoxal in water and biological matrices by capillary zone electrophoresis with diode array detection*. Electrophoresis, 2005. **26**: p. 1760–1767.
59. Whittaker, P., et al., *Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells*. Food and Chemical Toxicology, 2008. **46**: p. 2928–2933.
60. Harber, P., K. Saechao, and C. Boomus, . , *Diacetyl-induced lung disease*. Toxicol. Rev., 2006. **25**: p. 261–272.
61. Ramos, R.M., et al., *Determination of free and total diacetyl in wine by HPLCeUV using gas-diffusion microextraction and pre-column derivatization*. Food Control, 2012. **24**: p. 220-224.
62. Amoroso, A., G. Maga, and M. Daglia, *Cytotoxicity of alfa-dicarbonyl compounds submitted to in vitro simulated digestion process*. Food Chemistry, 2013. **140**: p. 654–659.
63. Weigel, K., T. Opitz, and T. Henle, *Studies on the occurrence and formation of 1,2-dicarbonyls in honey*. European Food Research and Technology, 2004. **218**: p. 147–151.
64. Atrott, J., S.Haberlau, and T. Henle, *Studies on the formation of methylglyoxal from dihydroxyacetone in Manuka (Leptospermum scoparium) honey*. Carbohydrate Research 2012. **361**: p. 7–11.
65. Majtan, J., *Methylglyoxal—A Potential Risk Factor of Manuka Honey in Healing of Diabetic Ulcers*. Hindawi Publishing Corporation, 2009. **2011**.
66. Adams, C.J., M. Manley-Harris, and P.C. Molan, *The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (Leptospermum scoparium) honey*. Carbohydrate Research, 2009. **344**: p. 1050–1053.
67. Kean Aj Fau - Grosjean, E., et al., *On-road measurement of carbonyls in California light-duty vehicle emissions*. Sci. Technol, 2001. **35** (0013-936X (Print)): p. 4198.
68. Grosjean, E., P. Green, and D. Grosjean, *Liquid Chromatography Analysis of Carbonyl (2,4-Dinitrophenyl)hydrazones with Detection by Diode Array Ultraviolet Spectroscopy and by Atmospheric Pressure Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry*. Anal Chem., 1999 **71**: p. 1851-1861.
69. Tuazon Ec Fau - Macleod, H., et al., *.alpha.-Dicarbonyl yields from the NOx-air photooxidations of a series of aromatic hydrocarbons in air*. Sci.Technol, 1986. **20**(0013-936X (Print)): p. 383.
70. Hatakeyama, S., H. Akimoto, and N. Washida, *Reactions of OH with α -pinene and β -pinene in air: Estimate of global CO production from the atmospheric oxidation of terpenes*. Journal of Geophysical Research: Atmospheres, 1991. **96**: p. 947–958.
71. Cui-Cui, M., et al., *Determination of Dicarbonyl Compounds in Ambient Fine Particles by Liquid Chromatography after 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivative*. Chin J Anal Chem, 2010 **38**: p. 1573–1577.
72. Diaz, A., F. Ventura, and M.T. Galceran, *Identification of 2,3-butanedione (diacetyl) as the compound causing odor events at trace levels in the Llobregat River and Barcelona's treated water (Spain)*. Journal of Chromatography A, 2004. **1034**: p. 175–182.
73. Ojeda, A.G., *High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent*. Anal. Biochem, 2014.
74. Mansilla, A.E., et al., *High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors*. Analytical Biochemistry, 2007. **371**: p. 82–91.

75. Wu, M.Y., et al., *A novel derivatization approach for simultaneous determination of glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone in plasma by gas chromatography–mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2008. **1204**: p. 81-86.
76. Agalou, S., et al., *Estimation of α -oxoaldehydes formed from the degradation of glycolytic intermediates and glucose fragmentation in blood plasma of human subjects with uraemia*. International Congress Series, 2002. **1245**(0): p. 181-182.
77. Neng, N.R., et al., *Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization*. Journal of Chromatography A, 2007. **1169**(1–2): p. 47-52.
78. Zardari, L.A., M.Y. Khuhawar, and A.J. Laghari, *Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent*. Chromatographia, 2009. **70**: p. 891–897.
79. Khuhawar, M.Y., L.A. Zardari, and A.J. Laghari, *Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization with 1,2-diaminopropane*. Journal of Chromatography B, 2008. **873**: p. 15–19.
80. Lo, C.-Y., et al., *Reactive dicarbonyl compounds and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural in carbonated beverages containing high fructose corn syrup*. Food Chemistry, 2008. **107**: p. 1099–1105.
81. Marceau, E. and V.A. Yaylayan, *Profiling of r-Dicarbonyl Content of Commercial Honeys from Different Botanical Origins: Identification of 3,4-Dideoxyglucoson-3-ene (3,4-DGE) and Related Compounds*. Agric. Food Chem, 2009. **57**: p. 10837–10844.
82. Nogueira, J.M.F., *Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques*. Analytica Chimica Acta, 2012. **757**(0): p. 1-10.
83. Ochiai, N., et al., *Sequential stir bar sorptive extraction for uniform enrichment of trace amounts of organic pollutants in water samples*. Journal of Chromatography A, 2008. **1200**(1): p. 72-79.
84. González-Velasco, J., *Electro-oxidation mechanism of glyoxal on a gold electrode in acidic media*. Journal of Power Sources, 1989. **27**(4): p. 273-286.
85. Zhang, J., et al., *A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples*. J Chromatogr A, 2010. **1217**: p. 5124–5129.
86. Nemet, I., L. Varga-Defterdarovic, and Z. Turk, *Preparation and quantification of methylglyoxal in human plasma using reverse-phase high - performance liquid chromatography*. Clin Biochem, 2004. **37**(10): p. 875-881.
87. McLellan, A.C., S.A. Phillips, and P.J. Thornalley, *The assay of methylglyoxal in biological systems by derivatization with 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene*. Anal Biochem, 1992. **206**(1): p. 17-23.
88. Chaplen, F.W., W.E. Fahl, and D.C. Cameron, *Method for determination of free intracellular and extracellular methylglyoxal in animal cells grown in culture*. Anal Biochem, 1996. **238**(2): p. 171-8.
89. Akira, K., Y. Matsumoto, and T. Hashimoto, *Determination of urinary glyoxal and methylglyoxal by high-performance liquid chromatography*. Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p. 147-53.
90. Randell, E.W., S. Vasdev, and V. Gill, *Measurement of methylglyoxal in rat tissues by electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005. **51**(2): p. 153-7.

91. Neng, N.R., et al., *Determination of glyoxal and methylglyoxal in environmental and biological matrices by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization*. J Chromatogr A, 2007. **1169**(1-2): p. 57-52.
92. Khuhawar, M.Y., A.J. Kandhro, and F.D. Khand, *Liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal from serum of diabetic patients using meso-stilbenediamine as derivatizing reagent*. Anal Lett, 2006. **39**(10): p. 2205-2215.
93. Pripis-Nicolau, L., J.C. Barbe, and A. Bertrand, *The detection of alpha-dicarbonyl compounds in wine by romaton of quinoxaline derivatives*. Journal of the science of food and agriculture, 2000. **80**: p. 102-108.
94. Cordeiro, C.F. and A.P. Freire, *Methylglyoxal assay in cells as 2-methylquinoxaline using 1,2-diaminobenzene as derivatizing reagent*. Anal Biochem., 1996. **234**(0003-2697 (Print)): p. 221-224.
95. Deng, Y. and P.H. Yu, *Simultaneous Determination of Formaldehyde and Methylglyoxal in Urine: Involvement of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase-Mediated Deamination in Diabetic Complications*. Chromatogr. Sci, 1999. **37**: p. 317.
96. Uchiyama, S., et al., *Determination of orthophthalaldehyde in air using 2,4-dinitrophenylhydrazine-impregnated silica cartridge and high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr A., 2006. **1116**: p. 165-171.
97. Revel, G., et al., J Sci Food Agric, 2000. **80**: p. 102-108.
98. Fujioka, K. and T. Shibamoto, *Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke*. Environ Toxicol, 2006. **21**(1): p. 47-54.
99. Nemet, I., L. Varga-Defterdarovic, and Z. Turk, *Methylglyoxal in food and living organisms*. Mol Nutr Food Res, 2006. **50**: p. 1105-1117.
100. Otsuka, M. and S. Ohmori, *Simple and sensitive determination of diacetyl and acetoin in biological samples and alcohol beverages*. J Chromatogr, 1992. **577**: p. 215-220.
101. Espinosa-Mansilla, A., I. Duran-Meras, and F. Salinas, *High-performance liquid chromatographic-fluorometric determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine by prederivatization to pteridinic rings*. Anal Biochem, 1998. **255**: p. 263-273.
102. Espinosa-Mansilla, A., et al., *High-performance liquid chromatographic determination of glyoxal and methylglyoxal in urine by prederivatization to lumazinic rings using in serial fast scan fluorimetric and diode array detectors*. Anal Biochem, 2007. **371**: p. 82-91.
103. Khuhawar, M.Y., L.A. Zardari, and A.J. Laghari, *Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization with 1,2-diaminopropane*. J Chromatogr B, 2008. **873**: p. 15-19.
104. Zardari, L.A., K. M.Y, and L. A.J., *Capillary GC analysis of glyoxal and methylglyoxal in the serum and urine of diabetic patients after use of 2,3-diamino-2,3-dimethylbutane as derivatizing reagent*. Chromatographia, 2009. **70**: p. 891-897.
105. Hurtado-Sanchez, M.C., et al., *Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples*. J Sep Sci, 2012. **35**: p. 2575-2584.
106. Ojeda, A.G., et al., *Effect of Cd(II) and Se(IV) exposure on cellular distribution of both elements and concentration levels of glyoxal and methylglyoxal in Lepidium sativum*. Metallomics, 2013. **5**: p. 1254-1261.
107. J. Degen, M. Hellwig, and T. Henle, *1,2-Dicarbonyl compounds in commonly consumed foods*. J. Agric. Food Chem, 2012. **60**: p. 7071-7079.

108. Saison, D., et al., *Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**: p. 5061–5068.
109. Daglia, M., et al., *Identification and quantification of α -dicarbonyl compounds in balsamic and traditional balsamic vinegars and their cytotoxicity against human cells*. Journal of Food Composition and Analysis 2013. **31** p. 67–74.
110. Degen, J., M. Hellwig, and T. Henle, *1,2-Dicarbonyl Compounds in Commonly Consumed Foods*. J. Agric. Food Chem, 2012. **60**: p. 7071–7079.

