



Cyprus  
University of  
Technology

Faculty of Geotechnical  
Sciences and  
Environmental  
management

**Doctoral Dissertation**

**STUDY OF MAILLARD REACTIONS WITH COUPLED  
CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROSCOPIC  
TECHNIQUES**

**Aristodimos Ioannou**

**Limassol, September 2017**



CYPRUS UNIVERSITY OF TECHNOLOGY  
FACULTY OF GEOTECHNICAL SCIENCES AND  
ENVIRONMENTAL MANAGEMENT  
DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND  
TECHNOLOGY

Doctoral Dissertation

STUDY OF MAILLARD REACTIONS WITH COUPLED  
CHROMATOGRAPHIC AND SPECTROSCOPIC  
TECHNIQUES

Aristodimos Ioannou

Limassol, September 2017

## **Copyrights**

Copyright © 2017 Aristodimos Ioannou

All rights reserved.

The approval of the dissertation by the Department of Environmental Science and Technology does not imply necessarily the approval by the Department of the views of the writer.

## **ABSTRACT**

The present research work was aimed to study model Maillard reactions by a combination of analytical techniques such as HPLC, UV-vis and ATR-FTIR spectroscopies. The Maillard reaction involves a complex network of chemical reactions that occur in food after processing at high temperatures. A further purpose of this study was to develop simple spectroscopic methods of application of the spectroscopic properties of the food constituents.

The reaction of asparagine and fructose at high temperature was studied by the coupling technique of HPLC-ATR-FTIR. The coupling of high performance liquid chromatography (HPLC) with FTIR detection provides a further capability for confirming chemical system changes in a new experimental layout.

Furthermore, the formation of the Amadori products was identified by employing a combined analytical technique of Solid Phase Extraction (SPE) and Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR).

The isolation of reaction products of asparagine with reducing sugars at alkaline pH and high temperature was probed by a combination of high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a Fraction Collector. The reaction products were analyzed by UV-vis and Fourier transform infrared (FTIR) spectrophotometry. The UV-vis and FTIR spectra of the isolated Maillard reaction products showed structure-sensitive changes as depicted by deamination events and formation of asparagine-saccharide conjugates. Evidence for Cu (II) metal ion complexation with the Maillard reaction products is supported by UV-Vis and FTIR spectroscopy.

The same model system was utilized to investigate the interaction of Maillard reaction products formed by the reactions of saccharide-derived compounds creating intermediates with proteins, more specifically with hemoglobin and myoglobin. The spectral events upon addition of discrete MRPs to hemoglobin and myoglobin were monitored. This led to the formation of a modified protein adduct known as a hemichrome.

Additionally, fluorescence spectroscopy was employed as a complementary technique to study the reaction of hemoglobin with MRPs from an asparagine-sugar model

system. The modification of hemoglobin by MRPs was illustrated through tryptophan-specific changes in the fluorescent spectra.

## **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η παρούσα ερευνητική εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη μοντέλων αντιδράσεων Maillard με συνδυασμό αναλυτικών τεχνικών, όπως η χρωματογραφία HPLC και η φασματοσκοπία UV-vis και ATR-FTIR. Η αντίδραση Maillard περιλαμβάνει ένα σύνθετο δίκτυο χημικών αντιδράσεων που εμφανίζονται σε τρόφιμα μετά από επεξεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες. Ένας περαιτέρω σκοπός αυτής της μελέτης είναι η ανάπτυξη απλών φασματοσκοπικών μεθόδων εφαρμογής των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων των συστατικών των τροφίμων.

Η αντίδραση της ασπαραγίνης και της φρουκτόζης σε υψηλή θερμοκρασία μελετήθηκε με την τεχνική σύζευξης της HPLC-ATR-FTIR. Η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με την ανίχνευση FTIR, παρέχει μια περαιτέρω δυνατότητα επιβεβαίωσης των αλλαγών του χημικού συστήματος σε μια νέα πειραματική διάταξη.

Επιπλέον, ο σχηματισμός των προϊόντων Amadori ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια συνδυασμένη αναλυτική τεχνική της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE) και της φασματοσκοπίας υπέρυθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλασης με μετασχηματισμό Fourier (ATR-FTIR).

Η απομόνωση των προϊόντων αντίδρασης της ασπαραγίνης με αναγωγικά σάκχαρα σε αλκαλικό pH και υψηλή θερμοκρασία ανιχνεύθηκε με συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), σε συνδυασμό με έναν συλλέκτη κλασμάτων. Τα προϊόντα αντίδρασης αναλύθηκαν με φασματοφωτομετρία ορατού-υπεριώδους (UV-vis) και υπέρυθρης ακτινοβολίας με μετασχηματισμό Fourier (FTIR). Τα φάσματα ορατού-υπεριώδους (UV-vis) και FTIR των απομονωθέντων προϊόντων αντίδρασης Maillard έδειξαν αλλαγές ευαίσθητες στη δομή όπως συσχετίζονται με απαμίνωση και σχηματισμό συζυγών ασπαραγίνης-σακχαρίτη. Η απόδειξη για τη σύμπλεξη ιόντων μετάλλων χαλκού Cu(II) με τα προϊόντα αντίδρασης Maillard υποστηρίζεται από τη φασματοσκοπία UV-vis και FTIR.

Το ίδιο μοντέλο συστήματος χρησιμοποιήθηκε για να διερευνηθεί η αλληλεπίδραση των προϊόντων αντίδρασης Maillard που σχηματίστηκαν από τις αντιδράσεις των

προερχόμενων από σακχαρίτη ενώσεων, δημιουργώντας ενδιάμεσα με πρωτεΐνες, πιο συγκεκριμένα με αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη. Παρατηρήθηκαν τα φασματικά γεγονότα κατά την προσθήκη διαφορετικών προϊόντων αντίδρασης Maillard (MRPs) σε αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη. Αυτό οδήγησε στον σχηματισμό μιας τροποποιημένης πρωτεϊνικής μορφής, γνωστής ως αιμόχρωμα (hemichrome).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία φθορισμού ως συμπληρωματική τεχνική για τη μελέτη της αντίδρασης της αιμοσφαιρίνης με τα προϊόντα αντίδρασης Maillard (MRPs) από ένα σύστημα μοντέλου ασπαραγίνης-μονοσακχαρίτη. Η τροποποίηση της αιμοσφαιρίνης από τα προϊόντα αντίδρασης Maillard (MRPs) απεδείχθη μέσω συγκεκριμένων αλλαγών στην τρυπτοφάνη στα φάσματα φθορισμού.