

Bestimmung von Furosin aus pasteurisierter Milch mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Flüssigchromatographie

Von I. Clawin-Rädecker und E. Schlimme

Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchwissenschaft, Kiel

1. Einleitung

Wärmebehandlung von Milch führt zu einer Keimreduzierung und geht mit chemischen Veränderungen einher, die die nutritive Qualität und die funktionellen Eigenschaften der Milchbestandteile beeinflussen können. Als geeigneter chemischer Indikator für die Kennzeichnung der Wärmebehandlung von Konsummilch hat neben Lactulose und säurelöslichem β -Lactoglobulin in jüngerer Zeit verstärkt die Bestimmung von ϵ -N-(2-Furoylmethyl)-L-lysin (Furosin) an Bedeutung gewonnen (1-15). Furosin (Abb. 1) entsteht neben Pyridosin und Lysin bei der sauren Hydrolyse von proteingebundenem ϵ -Lactulosyllysin, dem Hauptzwischenprodukt der frühen Maillard-Reaktion (1,2). Furosin wurde erstmalig von Erbersdobler und Zucker in Milchpulverhydrolysaten nachgewiesen (16) und in den Arbeitskreisen von Heyns (17) sowie Finot (18) chemisch-strukturell zugeordnet.

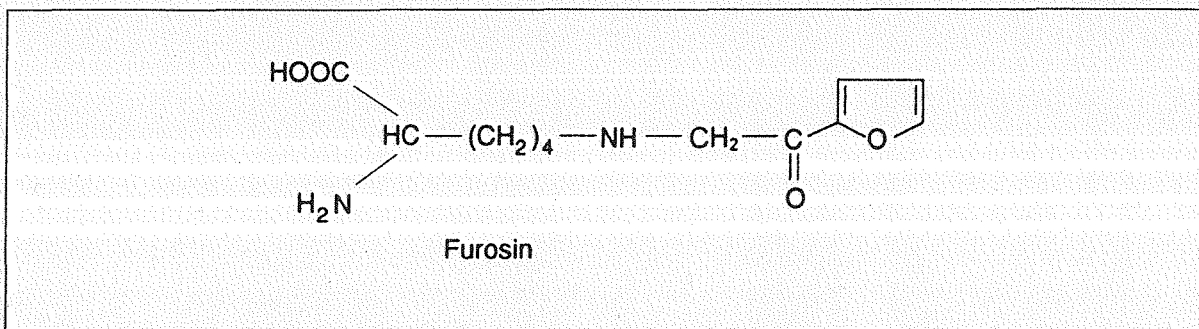


Abb. 1: Furosin (Strukturformel)

Die Bestimmung des Furosins ist sowohl direkt über Ionenaustauschchromatographie als auch nach Derivatisierung zu Heptafluorobutyrylisobutylester mittels verschiedener chromatographischer Techniken (1,19) möglich. Aufgrund des großen methodischen Aufwandes und der für schwach erhitzte Milchproben zu hohen Nachweisgrenze liegt bislang nur eine geringe Anzahl an Ergebnissen über Furosingehalte von Milchen und Milchprodukten im Pasteurisierungsbereich vor. Die Entwicklung einer Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie an speziellen C8-Phasenmaterialien erlaubt nunmehr einen direkten Nachweis des Furosins mit hoher Wiederfindung und Wiederholbarkeit bei niedriger Nachweisgrenze von 0,3 pmol Furosin je Analyse (2). Furosin konnte mit dieser Methode selbst in Rohmilch nach saurer Hydrolyse mit einer Konzentration zwischen 3-5 mg/100 g Protein nachgewiesen werden, d.h. in einer Menge, die um eine Größenordnung über der Nachweisgrenze (0,3 pmol Furosin entsprechen 0,3 mg/100 g Protein bei einem Milchproteingehalt von 3,2 %) liegt. Peroxidase-positive pasteurisierte Milch sollte nach Berichten aus der Arbeitsgruppe von Resmini (5) Furosingehalte nicht über 7 mg/100 g Protein aufweisen. Höhere Furosingehalte könnten auf eine Zugabe von hochehrhitzter und/oder rekonstituierter Milch zurückzuführen sein. In dieser Arbeit wurde pasteurisierte Milch des Handels auf ihre Furosingehalte hin untersucht, um Hinweise auf die Furosinbildung bei den in den Molkereien angewandten Homogenisierungs- und Pasteurisierungsverfahren zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Probenmaterial

Pasteurisierte Konsummilch von sieben verschiedenen bundesdeutschen Molkereien wurden im Handel erworben und auf ihre Peroxidaseaktivität mittels Traventol (VDLUFA-Methodenbuch VI C 13.2) getestet. In allen untersuchten Milchen konnte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden.

2.2 Standardmaterial für die Furosinbestimmung

Als Referenzmaterial für die liquidchromatographische Bestimmung (HPLC) wurde Furosin von der Firma Neosystem Laboratoire (Straßburg, Frankreich) mit einer ca. 60%igen Reinheit (Lot HFX VII-99F3) verwendet. 0,6 mg Substanz wurden in 25 ml 0,1 mol/l HCl gelöst und die Konzentration von Furosin photometrisch bei 280 nm ($\epsilon = 15,316 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) bestimmt. Die Stammlösung ist bei -20°C mehrere Monate stabil und wird für die direkte Injektion mit 0,1 mol/l HCl auf vergleichbare Konzentrationen wie die zu analysierende Probe verdünnt.

2.3 Saure Hydrolyse

2 ml Milch werden mit 6 ml 10,6 mol/l HCl in ein 10 ml Pyrex-Probengefäß mit Schraubverschluß pipettiert und mehrere Minuten mit Helium begast und danach verschlossen. Die Hydrolyse erfolgt bei 110°C über 23 h. Nach ca. 1 h wird die Probe vorsichtig geschwenkt. Das abgekühlte Hydrolysat wird über Papierfilter filtriert und kann bis zur Analyse eingefroren werden. Das Filtrat wird vor der Injektion auf die HPLC-Säule über C18-Kartuschen (Sep-Pak plus C18, ca. 375 mg, Waters, Eschborn) aufgereinigt. Die Kartuschen werden mit 5 ml Methanol konditioniert und mit 10 ml H_2O gespült. 0,5 ml des Hydrolysates werden auf die Kartusche gegeben und das verdrängte Eluat verworfen. Eine Überprüfung ergab keinen positiven Nachweis von Furosin im verdrängten Eluat. Die in dieser Arbeit verwendeten Sep-Pak-Kartuschen (ca. 375 mg) besitzen somit unter den gewählten Bedingungen eine ausreichende Kapazität. Furosin wird mit 3 ml 3 mol/l HCl von der Kartusche eluiert, wobei ca. 3,15 ml Eluat aufgefangen werden.

2.4 Chromatographische Bedingungen

HPLC-Apparatur: Probenaufgeber BT 7041 mit PEEK-Injektor (Biotronik-Eppendorf, Maintal); Controller LCC 2252 (Pharmacia LKB, Freiburg); Intelligente Pumpe L 6200A (Merck-Hitachi, Darmstadt); UV-VIS Detektor L4250 (Merck-Hitachi); Auswertesystem (PC Integration Pack Version 3.9, Kontron, Neufahrn). Analytische Säule: modifizierte C8-Phase (250 mm, I.D. 4,6 mm), (Alltech, Unterhaching). Säulentemperatur: 34°C . Laufmittel A: 0,4 % Essigsäure (v/v), Laufmittel B: 27 % KCl in Laufmittel A (w/v). Gradientenprogramm: Anteile (%) an Laufmittel B in Laufmittel A (v/v) von 0-12,5 min 0 %, 12,5 \rightarrow 19,5 min linear auf 50 %, 19,5-22,0 min 50 %, 22,0 \rightarrow 24,0 min linear auf 0 %, 24,0-32,0 min 0 %. Flußrate: 1,2 ml/min. Detektion: $\lambda = 280 \text{ nm}$. Aufgabevolumen: 20 μl .

2.5 Eiweißbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes des filtrierten Hydrolysates erfolgte mittels Halbmikroverfahren nach Kjeldahl (VDLUFA-Methodenbuch VI C 30.2).

3. Ergebnisse und Diskussion

Furosin wird unter den vorstehend beschriebenen Analysenbedingungen als basisliniengetrennter Peak mit einer Retentionszeit von 22,2 min eluiert; Milchfurosin wurde neben

seinem isochromatographischen Verhalten UV-spektroskopisch durch Vergleich mit authentischem Furosin charakterisiert. Neben Furosin werden in der Milchprobe mindestens 8 weitere, bislang nicht näher chemisch charakterisierte Verbindungen eluiert, die im Verlaufe der sauren Hydrolyse der Milch gebildet und durch die Probenaufarbeitung nach der Hydrolyse nicht abgetrennt werden (Abb. 2); zwei dieser Verbindungen entstehen offenbar im Verlaufe der Wärmebehandlung der Milch.

Die Peakfläche des wässrigen Standards mit einer Konzentration von 22,8 pmol in 20 µl Aufgabevolumen wurde mit einem Variationskoeffizienten von 1,7 % innerhalb eines Tages (Serienanalyse) bestimmt. Die Impräzision über drei Tage (Tag zu Tag-Analyse) weist ebenfalls einen sehr niedrigen Variationskoeffizienten von 2,7 % auf. Eine lineare Abhängigkeit der Peakfläche vom Furosingehalt der Standardlösung ist für einen Konzentrationsbereich, wie er unter Temperatur-Zeit-Bedingungen von der Pasteurisierung über die Ultraheißbehandlung bis zur Sterilisierung zu erwarten ist, gegeben (Abb. 3). Die matrixabhängige Wiederfindung des Furosin wurde durch Aufstockung einer pasteurisierten Milch vor der Hydrolyse untersucht. Furosin wurde zu 93 % wiedergefunden. Die Impräzision der Furosin-Messung mehrerer unabhängig voneinander hydrolysierten Milchproben (n=5) einer wärmebehandelten Milch liegt bei 2,8 %. Die Hauptfehlerquelle der Methode ist in der Wiederholbarkeit der Hydrolyse und der Probenaufarbeitung zu sehen. Die Wiederholbarkeit der Probenaufarbeitung des Milch-Hydrolysates wurde im Rahmen eines EU-Ringversuches an 4 verschiedenen Hydrolysaten (Proben wurden von Prof. P. Resmini, Mailand zur Verfügung gestellt) untersucht (Tab. 1). Hierbei konnte eine gute Wiederholbarkeit der zweifach durchgeführten Aufarbeitung über Sep-Pak-Kartuschen festgestellt werden.

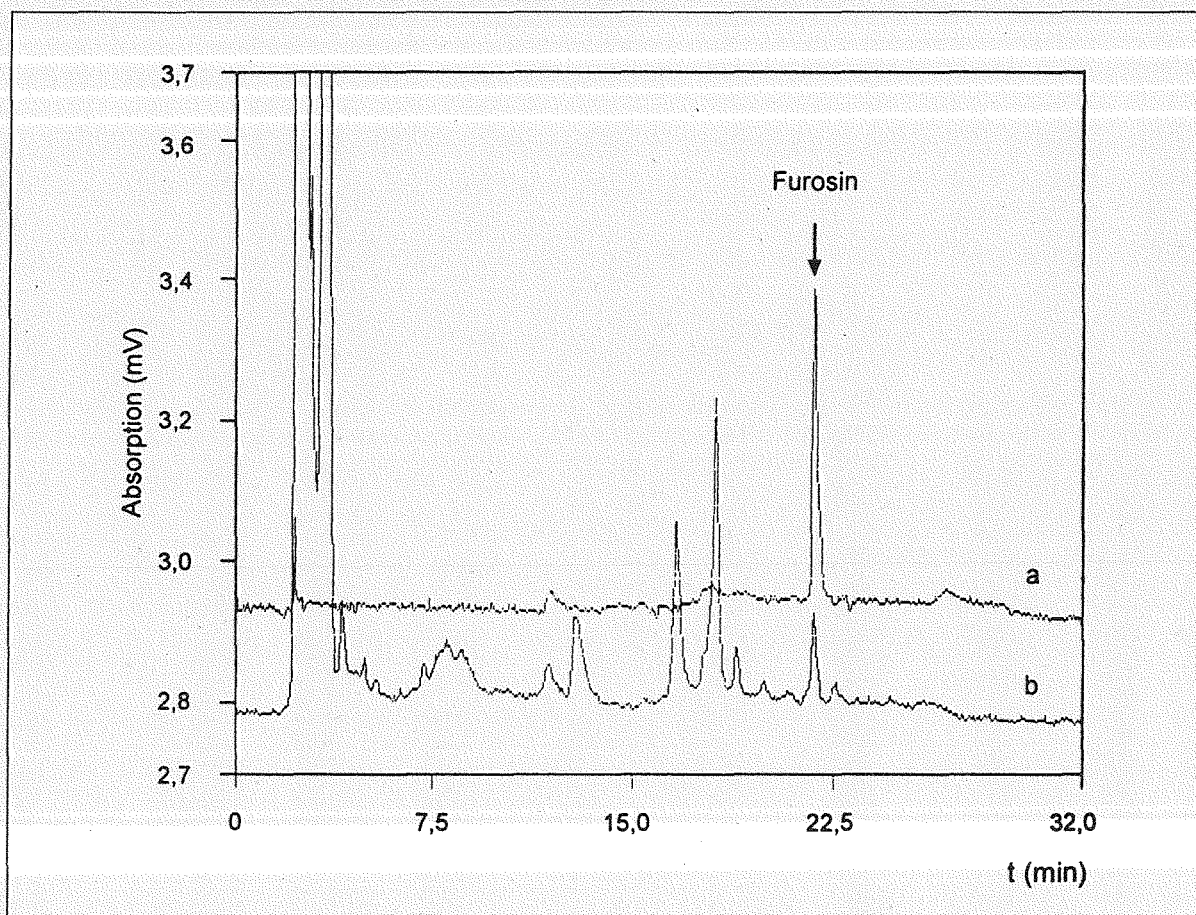


Abb. 2: HPLC-Chromatogramme eines Furosin-Standards (a) und einer pasteurisierten Milch (b)

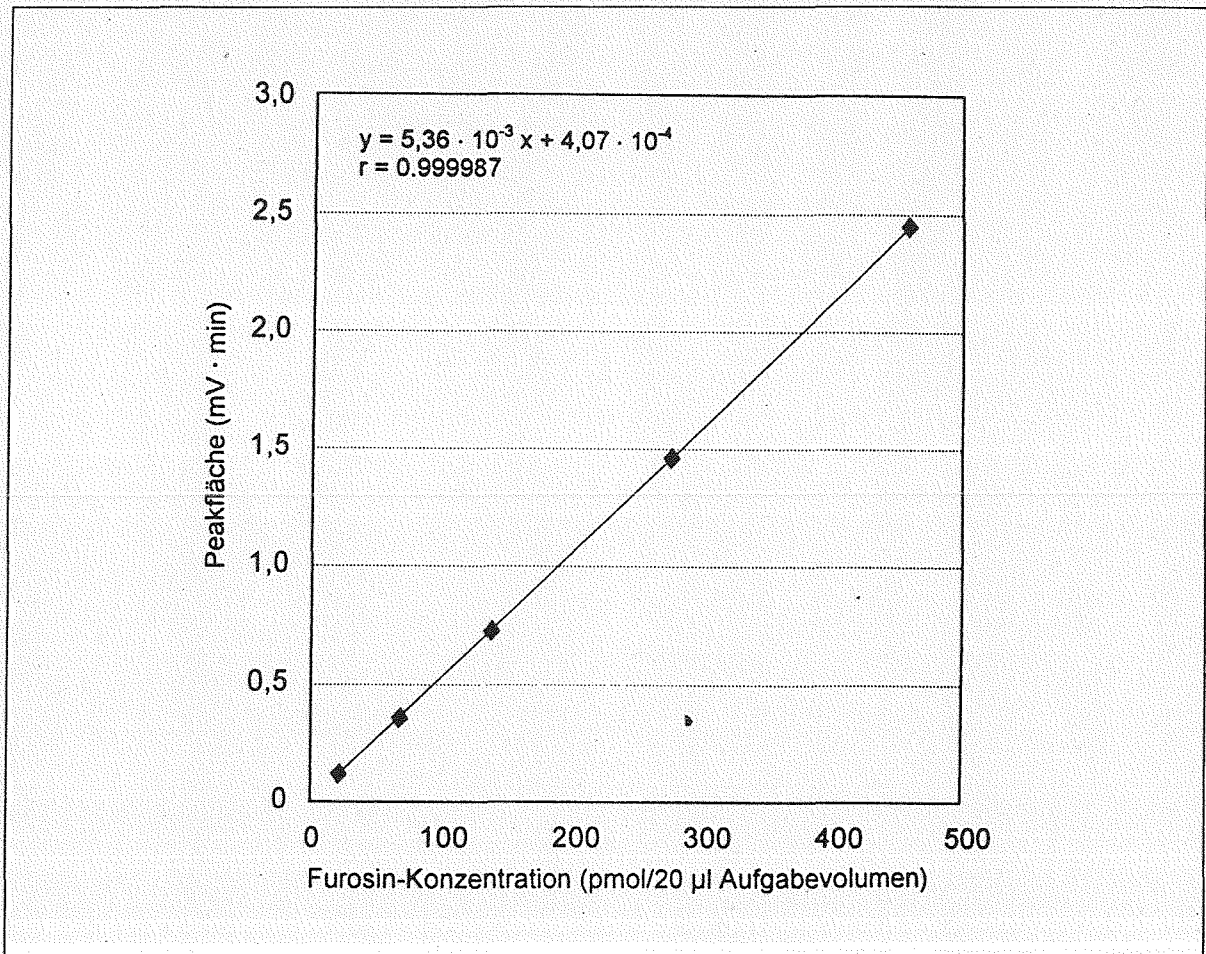


Abb. 3: Lineare Abhängigkeit der Peakfläche (mV · min) vom Furosingehalt der Standardlösung

Tab. 1: Wiederholbarkeit der Probenaufarbeitung von 4 unterschiedlich wärmebehandelten, hydrolysierten Milchproben über Sep-Pak-Kartuschen^a

	Proben							
	1		2		3		4	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Furosin (mg/100 g Protein)	7,3	6,9	9,7	9,3	12,7	12,4	19,6	19,4

^a Kieler Analysenergebnisse des EU-Ringversuches

Tab. 2: Furosingehalte von pasteurisierter Milch des Handels

	Proben													
	1		2		3		4		5		6		7	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Furosin (mg/100 g Protein)	6,4	7,3	6,0	6,6	6,1	6,1	6,2	6,3	6,1	6,6	6,6	6,6	6,9	6,5

^a Erste Hydrolyse; ^b zweite Hydrolyse

Darüber hinaus wurden 7 homogenisierte und pasteurisierte Milchen des Handels auf ihren Furosingehalt analysiert, die alle Peroxidase-positiv waren. Die Milchen enthielten 3,5 % Fett, mit Ausnahme von Probe 2 mit 1,5 % Fett und Probe 7 mit 3,8 % Fett (laut Deklaration). Der Furosingehalt wurde bei allen Milchen im engen Bereich zwischen 6,0 und 7,3 mg/100 g Protein ermittelt (Tab. 2). In keinem Fall wurde der derzeit für den Bereich der Europäischen Union diskutierte Grenzwert von 8 mg Furosin/100 g Protein für Peroxidase-positive pasteurisierte Milch überschritten. Weitere Untersuchungen über den Einfluß der einzelnen Verfahrensschritte (Separierung, Homogenisierung, Thermisierung und Pasteurisierung) auf die Bildung von Protein-gebundenem Lactulosyllysin und dem daraus hydrolytisch freigesetzten Furosin müssen noch folgen, um die Eignung von Furosin als Hitzeindikator für den Thermisierungs- und Pasteurisierungsbereich von Milch und Milchprodukten zu bestätigen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Europäischen Kommission VO (EWG) Nr. 1116/92 dankenswerter Weise gefördert. Frau Maren Schmidt danken wir für sorgfältige Mitarbeit bei den analytischen Untersuchungen.

4. Literatur

- (1) Erbersdobler, H.F., Dehn-Müller, B.: International Dairy Federation, Bulletin **238** 62-67 (1989)
- (2) Resmini, P., Pellegrino, L., Battelli, G.: Ital. J. Food Sci. **3** 173-183 (1990)
- (3) Poretta, S.: J. Chromatogr. **624** 211-219 (1992)
- (4) Lopez-Fandino, R., Corzo, N., Villamiel, M., Delgado, T., Olano, A., Ramos, M.: J. of Food Protection **56** (3) 263-264,269 (1993)
- (5) Resmini, P., Pellegrino, L., Masotti, F.: International Dairy Federation, Special Issue **9303** 153-164 (1993)
- (6) Resmini, P., Pellegrino, L.: International Dairy Federation, Bulletin **298** 31-36 (1994)
- (7) Corzo, N., Lopez-Fandino, R., Delgado, T., Ramos, M., Olano, A.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **198** 302-306 (1994)
- (8) Pellegrino, L.: Netherland Milk and Dairy Journal **48** 71-80 (1994)
- (9) Evangelisti, F., Calcagno, C., Zunin, P.: J. Food Sci. **59** (2) 335-337 (1994)
- (10) Dehn-Müller, B., Müller, B., Lohmann, M., Erbersdobler, H.F.: In: Barth, C.A. & Schlimme, E.(Eds), Milk Proteins, Nutritional, Clinical, Functional and Technological Aspects. Steinkopff Verlag, Darmstadt, S. 228-232 (1989)
- (11) Nangpal, A., Reuter, H., Dehn-Müller, B., Erbersdobler H.F.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **42** 43-51 (1990)
- (12) Nangpal, A., Reuter, H., Kiesner, C.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **42** 53-64 (1990)
- (13) Nangpal, A., Reuter, H.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **42** 77-86 (1990)
- (14) Erbersdobler, H.F., Dehn, B., Nangpal, A., Reuter, H.: J. Dairy Res. **54** 147-151 (1987)
- (15) Pellegrino, L., Resmini, P., Luf, W.: In: Fox, P.F. (Ed.), Heat-Induced Changes in Milk. 2nd. Ed., International Dairy Federation, Brüssel, S. 409-453 (1995)
- (16) Erbersdobler, H.F., Zucker, H.: Milchwissenschaft **21** 564-568 (1966)
- (17) Heyns, K., Heukeshoven, J., Brose, K.: Angew. Chem. **80** 627 (1968)
- (18) Finot, P.A., Bricout, J., Viani, R., Mauron, J.: Experientia **24** 1097-1099 (1968)
- (19) Büser, W., Erbersdobler, H.F.: J. Chromatogr. **343** 363-368 (1985)

5. Zusammenfassung

Clawin-Rädecker, I., Schlimme, E.: **Bestimmung von Furosin aus pasteurisierter Milch mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Flüssigchromatographie.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47 (2) 168 - 173 (1995)

24 Pasteurisierte Milch (Furosin, chemischer Hitzeindikator)

In pasteurisierter Milch des Handels wurden die Gehalte an Furosin mit Hilfe der Ionenpaar-Umkehrphasen-Flüssigchromatographie bestimmt. Furosin ist hydrolytisch aus dem proteingebundenen ϵ -Lactulosyllysin, dem Hauptzwischenprodukt der frühen Maillard-Reaktion, zugänglich. Der Furosingehalt der thermisch nicht behandelten Rohmilch liegt zwischen 3 - 5 mg/100 g Protein und steigt in den untersuchten Handelsproben Peroxidase-positiver pasteurisierter Milch auf Werte zwischen 6,0 und 7,3 mg Furosin/100 g Protein an. Der derzeit für den Bereich der Europäischen Union diskutierte Grenzwert für Peroxidase-positive pasteurisierte Milch liegt bei 8 mg Furosin/100 g Protein. Höhere Furosingehalte in pasteurisierter Milch könnten auf eine Zugabe von hochoverhitzter und/oder rekonstituierter Milch zurückzuführen sein.

Summary

Clawin-Rädecker, I., Schlimme, E.: **Determination of furosine in pasteurised milk by use of ion-pair reversed-phase liquid chromatography.** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47 (2) 169-175 (1995)

24 pasteurised milk (furosine, chemical heat indicator)

Levels of the furosine content were determined in commercial pasteurized milk samples by use of ion-pair reversed-phase chromatography. Furosine is generated hydrolytically from protein-bound ϵ -lactulosyllysine which is the main chemical intermediate in the early stages of the Maillard reaction. The furosine content in thermally untreated milk ranges from 3 to 5 mg/g protein; values between 6.0 and 7.3 were found in this study in peroxidase-positive pasteurized milk for which a limit of 8 mg furosine/100 g protein is actually discussed in the European Union. Higher levels of furosine in pasteurized milk might be caused by addition of certain amounts of highly heat treated and/or reconstituted milk.

Résumé

Clawin-Rädecker, I., Schlimme, E.: **Détermination de la teneur en furosine dans le lait pasteurisé au moyen de la technique "ion-pair reversed-phase liquid chromatography".** Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 47 (2) 169-175 (1995).

24 Lait pasteurisé (furosine, indicateur de chaleur chimique)

On a déterminé les teneurs en furosine au moyen de la technique "ion-pair reversed-phase liquid chromatography" dans le lait pasteurisé du commerce. La furosine est engendrée hydrolytiquement à partir de l' ϵ -lactulosyllysine liée aux protéines, le principal intermédiaire au début de la réaction de Maillard. La teneur en furosine dans le lait pas traité

thermiquement varie entre 3-5 mg/100 g protéine et s'élève à des valeurs entre 6.0 et 7.3 mg furosine/100 g protéine dans les échantillons du lait pasteurisé du commerce étudiés contenant de la peroxidase. La valeur limite discutée actuellement dans la UE pour le lait pasteurisé contenant de la peroxidase est de l'ordre de 8 mg furosine/100 g protéine. Des teneurs plus élevées en furosine dans le lait pasteurisé pourraient être dues à l'addition du lait qui a été soumis à un chauffage drastique et/ou du lait reconstitué.