

Project 7131140

Harmonisatie/normalisatie methoden van onderzoek land- en tuinbouwproducten

Projectleider: J. de Jong

Rapport 98.015

maart 1998

INVENTARISATIE VAN HET FUROSINEGEHALTE IN VERSE GEPASTEURISEERDE MELK

J.J.H. Kobessén en J.F. Labrijn

afdeling: Kwaliteitsbewaking

DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)

Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen

Postbus 230, 6700 AE Wageningen

Telefoon 0317-475400

Telefax 0317-417717

Copyright 1998, DLO-Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwproducten (RIKILT-DLO)
Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur

auteur(s)

programmaleiders (2x)

in- en externe communicatie (2x)

bibliotheek (3x)

EXTERN:

Ministerie LNV, Directie Internationale Zaken, Den Haag (drs. W.A.M. van Kippersluis)

Ministerie LNV, Directie Industrie & Handel, Den Haag (drs. N. Schelling)

Ministerie LNV, Directie Milieu, Kwaliteit en Gezondheid, Den Haag (drs. P.H. Draaisma)

Ministerie LNV, Directie Wetenschap en Kennisoverdracht, Den Haag (prof. dr. L. van Vloten-Doting)

Inspectie Gezondheidsbescherming (IGB), Leeuwarden (drs. R.D. van Buuren)

Centraal Orgaan voor Kwaliteitsaangelegenheden in de Zuivel (COKZ), Leusden (ir. J.A. Jans)

Productschap voor Zuivel, Rijswijk (ing. R. Oost)

NIZO, Ede (dr.ir. C. Olieman)

Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO), Wageningen (ir. K.J. van Ast)

Consumentenbond, Den Haag (ir. L. van Nieuwland)

ABSTRACT

Inventarisatie van het furosinegehalte in verse gepasteuriseerde melk

Survey of the furosine content in pasteurized consumption milk

Report 98.015

March 1998

J.J.H. Kobessen and J.F. Labrijn

State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT-DLO)

P.O. Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands

4 tables, 5 annexes, 12 pages, 13 references

Furosine, a marker for the Maillard reaction, can be determined by Ion-Pair Reversed Phase Liquid Chromatography. Limits for furosine in pasteurized milk, temporarily set at 8.6 mg/100 g protein, are currently under discussion within the EU. Furosine levels in excess of these limits may be attributed to adulteration of the milk by addition of reconstituted milk. Furosine was determined in samples of commercially pasteurized, whole, medium and low fat milk from the Dutch market. The furosine values were compared with those in Italian, Belgium and Dutch market milk samples reported in the literature. Pasteurized consumption milk from the Dutch market does not exceed the limit for furosine in pasteurized milk of 8.6 mg/100 g protein. Moreover the addition of 1% skimmed milkpowder can readily be detected by means of furosine.

Keywords: Furosine; Maillard reaction; pasteurized milk; Dutch market; low-fat-, medium-fat- and whole-fat -milk; HPLC.

INHOUD	<u>blz</u>
ABSTRACT	1
SAMENVATTING	5
1 INLEIDING	7
1.1 Doel van het onderzoek	7
1.2 Theoretische beschouwingen	7
1.3 Beschouwingen vorig furosine onderzoek	9
2 MATERIAAL EN METHODE	10
2.1 Monstermateriaal	10
2.2 Methoden van onderzoek	10
2.2.1 Monstervoorbewerking	10
2.2.2 Eiwitbepaling	10
2.2.3 Furosinebepaling	10
3 RESULTATEN	11
4 CONCLUSIE	13
4.1 Conclusie	13
4.2 Aanbevelingen tot verder onderzoek	13
LITERATUUR	14
BIJLAGEN 1 T/M 5	

SAMENVATTING

Het furosinegehalte in melk kan worden gerelateerd aan de intensiteit van een warmtebehandeling van melk en is daarmee een indicator voor het toevoegen van melkpoeder aan verse gepasteuriseerde melk. Voor verse gepasteuriseerde melk is in het kader van EU verordening 92/46 voorlopig een grenswaarde opgesteld van 8,6 mg furosine per 100 gram eiwit. In Nederland is het toegestaan, mits gedeclareerd, om 1% droge melkbestanddelen aan melk toe te voegen.

In dit onderzoek is gekeken of de verse Nederlandse gepasteuriseerde consumptiemelk aan de voorlopige grenswaarde kan voldoen en zijn de gevonden gehalten vergeleken met gegevens uit de literatuur. Hierbij zijn diverse soorten melk (magere, halfvolle en volle melk) voornamelijk geproduceerd door de vier grote melkleverende bedrijven, onderzocht. Het furosinegehalte is bepaald met Ion-Pair Reversed Phase Chromatografie.

Van alle geteste melksoorten van alle melkproducerende bedrijven voldoet het furosinegehalte aan de voorlopige grenswaarde en komt deze overeen met gehalten weergegeven in de literatuur. Voor de Nederlandse situatie lijkt de voorgestelde grenswaarde van 8,6 mg furosine per 100 gram eiwit dus geen bezwaar op te leveren. Op basis van de gemeten furosinegehalten in monsters magere melk waaraan 1% droge melkbestanddelen was toegevoegd, bleek dat een dergelijke toevoeging detecteerbaar was.

1. INLEIDING

1.1 Doel van het onderzoek

Er zijn binnen de Europese Unie aanwijzingen dat er gereconstitueerde melk wordt toegevoegd aan verse gepasteuriseerde melk. Hoewel dit niet is toegestaan zijn dergelijke praktijken niet ondenkbaar omdat onder andere door de melkquota de aanvoer van de grondstof, rauwe melk, nog meer fluctueert dan in het verleden door seizoensinvloeden reeds het geval was. Controle hierop wordt daarom raadzaam geacht. Dit kan door middel van het bepalen van het furosinegehalte van melk. In het kader van EU-richtlijn 92/46 is er voorlopig een grenswaarde van 8,6 mg furosine per 100 g eiwit voor verse gepasteuriseerde melk opgesteld. Het RIKILT-DLO heeft als participant in de werkgroep Zuiveldeskundigen (DG VI) van de Europese Commissie mede als taak om vast te stellen grenswaarden te becommentariëren. Om deze reden heeft het RIKILT-DLO een onderzoek uitgevoerd naar de situatie op de Nederlandse markt op het gebied van verse melk. In Nederland wordt de markt beheerst door vier grote productiebedrijven van verse melk, namelijk Coberco, Friesland Dairy Foods, Campina en Menken van Grieken.

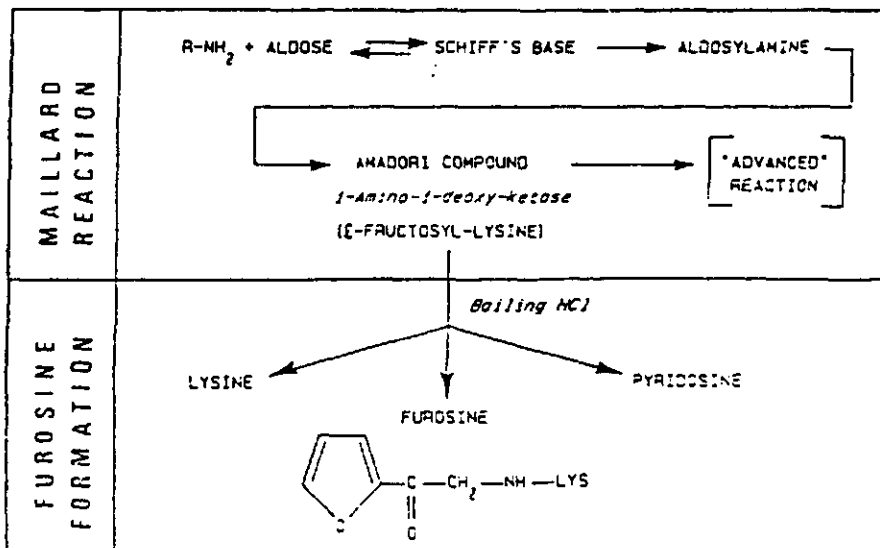
Het RIKILT-DLO heeft verse gepasteuriseerde melkmonsters door het hele land genomen, waarbij gestreefd is om de hele populatie te bemonsteren. In de werkgroep Zuiveldeskundigen is door de Italiaanse vertegenwoordiger Prof. Resmini (Universiteit van Milaan) een methode ingebracht voor het bepalen van furosine als parameter voor het aantonen van het toevoegen van gereconstitueerde melk. Het furosinegehalte is bepaald conform deze Italiaanse methode met behulp van Ion-Pair Reversed Phase Chromatography (IP-RP-HPLC) met UV-detectie bij 280 nm. Voor het kwantificeren van het furosinegehalte wordt gebruik gemaakt van een zuivere furosine standaard.

Furosine is een indicator voor de beginnende Maillardreactie in een suiker-eiwitrijk systeem. Maillardreacties treden sneller op wanneer eiwit-suikerhoudende producten worden verhit. Melkpoeder is langer verhit dan gepasteuriseerde melk en bevat daardoor een hoger furosinegehalte. Het is toegestaan, mits gedeclareerd, om 1% magere melkpoeder aan gepasteuriseerde melk toe te voegen. Naast het inventariseren van het furosinegehalte van verse gepasteuriseerde Nederlandse melk is in dit onderzoek nagegaan of een toevoeging van 1% magere melkpoeder aan gepasteuriseerde melk aan de hand van het furosinegehalte te achterhalen is. Tevens is er gekeken of er verband is tussen het vetgehalte respectievelijk de producent van de melk en het furosinegehalte.

1.2 Theoretische beschouwingen

Gepasteuriseerde melk reageert negatief op de fosfatase-test en positief op de peroxidase test. Teneinde dit effect te krijgen kunnen verschillende tijd/temperatuurcombinaties (minimaal 71,7 °C gedurende 15 seconden) in een pasteurisatieproces worden gehanteerd (12).

Een warmtebehandeling van melk veroorzaakt een bruiningsreactie, de zogenaamde Maillardreactie. Deze reactie vindt plaats tussen een reducerende suiker, zoals lactose, en een vrije aminogroep van een eiwit, voornamelijk de ϵ -amino-groep van lysine (6). De Maillardreactie, die ook voorkomt bij lage temperaturen, is relatief langzaam in voedsel met een hoog vochtgehalte. In voedsel met een laag vochtgehalte zoals melk- en weipoeder is het de overheersende reactie bij kamertemperatuur (4). Tijdens het begin van de Maillardreactie worden er Schiff's basen gevormd. Deze resulteren in de vorming van glucosylamines en daaropvolgend ϵ -N-deoxylactulosyl-l-lysine, de meest stabiele Amadori component. Door middel van een zure hydrolyse wordt ϵ -N-deoxylactulosyl-l-lysine gedeeltelijk omgezet in ϵ -N-2-furoylmethyl-l-lysine, furosine genoemd (2). In figuur 1 wordt de Maillardreactie en de vorming van furosine schematisch weergegeven.



Figuur 1 Schema van de Maillardreactie en de vorming van furosine(11).

1.3 Beschouwingen vorig furosine onderzoek

Furosine kan worden gebruikt als een betrouwbare indicator voor de intensiteit van een warmtebehandeling van melk. Gepasteuriseerde peroxidase positieve melk laat een karakteristieke range zien tussen 5 en 7 mg furosine per 100 g eiwit. Deze range werd onder andere gevonden voor melk afkomstig uit België en Italië (8,11).

De invloed van het vetgehalte van melk op het furosinegehalte werd bestudeerd door Pelligrino (7). Een toename van het vetgehalte van melk gaf een afname in het furosinegehalte. Als reden werd hiervoor gegeven dat met een toename van het vetgehalte de viscositeit toeneemt, de moleculaire beweging neemt hierdoor af en daardoor zal de warmteoverdracht worden gehinderd (7).

Onderzocht werd tot welk minimaal gehalte de toevoeging van melkpoeder aan gepasteuriseerde melk detecteerbaar was. Duidelijk werd dat het geen problemen geeft om toevoegingen van 1% droge melkbestanddelen aan verse gepasteuriseerde melk aan te tonen door middel van het furosinegehalte (8,10).

In februari '95 werd door de Italiaanse delegatie binnen de werkgroep Zuivel (DG VI) van de Europese Commissie een ringtest georganiseerd voor het vaststellen van een acceptabele grenswaarde voor het furosinegehalte in gepasteuriseerde melk. Hierbij zijn 86 peroxidase positieve gepasteuriseerde melkmonsters afkomstig uit 9 EU-landen onderzocht door 11 laboratoria. Er werd een gemiddeld furosinegehalte gevonden van 6,5 met een standaardafwijking van 0,7 mg furosine per 100 g eiwit. Rekening houdend met een marge van 3 keer de standaardafwijking, werd er voorlopig een grenswaarde opgesteld van 8,6 mg furosine per 100 g eiwit voor gepasteuriseerde melk (9).

Op verzoek van de Verenigde Consumptie Melkbedrijven werd in mei en augustus '95 een onderzoek verricht door RIKILT-DLO naar het furosinegehalte in gepasteuriseerde melk. De melkmonsters werden destijds geleverd door de vier grote zuivelbedrijven. Uit dit onderzoek werd duidelijk dat er een grote spreiding is in het furosinegehalte van melk geproduceerd door de verschillende melkleverende-bedrijven. Ter verduidelijking worden deze resultaten weergegeven in bijlage I. De resultaten zijn betrouwbaar, daarom zijn de vier zuivelbedrijven gecodeerd met A,B,C en D.

In juni '95 werd het furosinegehalte van de Nederlandse gepasteuriseerde melk bepaald door Resmini, door middel van een steekproef (9). Van 18 melkmonsters werd een gemiddeld furosinegehalte gevonden van 6,9 met een standaarddeviatie van 0,3 mg per 100 g eiwit. De in dit onderzoek berekende grenswaarde waaraan de Nederlandse melk kon voldoen was 7,9 mg furosine per 100 g eiwit (gem.waarde + 3 x sd).

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstermateriaal

Bij dit onderzoek is gebruik gemaakt van verse gepasteuriseerde Nederlandse melk. In de periode maart tot en met april '96 zijn in totaal 95 monsters ingekocht bij verschillende supermarkten door heel Nederland. De monsters zijn in tweevoud geanalyseerd. De melkmonsters zijn voornamelijk geproduceerd door de 4 grote Nederlandse melkleverende bedrijven gecodeerd A,B,C en D. Indien de producent onbekend is wordt de code O gebruikt. De monsters bestaan uit gepasteuriseerde magere- (m), halfvolle- (hv) en volle- (v) melk. De melksoorten worden onderscheiden op basis van het vetgehalte. Magere melk heeft een vetgehalte van ten hoogste 0,3%, halfvolle melk van tenminste 1,5 en ten hoogste 1,8% en volle melk bevat tenminste 3,5% vet (12). Tevens zijn er 11 magere melkmonsters ingekocht, waaraan volgens de ingrediëntendeclaratie 1% droge melkbestanddelen is toegevoegd.

2.2 Methoden van onderzoek

2.2.1 Monstervoorbewerking

De geleverde melkmonsters zijn voorbehandeld conform NEN 3742 (5).

2.2.2 Eiwitbepaling

Het eiwitgehalte van de hydrolysaten is bepaald volgens Kjeldahl conform IDF20B:1993 (3).

2.2.3 Furosinebepaling

Het furosinegehalte wordt bepaald conform de Italiaanse methode VI/CG/1018/94 ingebracht in de EU-werkgroep voor Zuiveldeskundigen. Deze methode, inclusief karakteristieke chromatogrammen en de bijbehorende chromatografische condities, zijn opgenomen in bijlage II en IIb.

3. RESULTATEN EN DISCUSSIE

In bijlage III worden de resultaten van de individuele bepalingen vermeld. Het gemiddelde furosinegehalte voor alle soorten, magere, halfvolle en de volle melk ($n = 95$) bedraagt 6,1 mg per 100 g eiwit met een standaarddeviatie van 0,4 (zie tabel 3.1). Het laagste gehalte is 5,3 en het hoogste gevonden gehalte is 7,3 mg furosine per 100 g eiwit. De range waarbinnen 95% van de melkmonsters valt ligt tussen de 5,3 en 6,9 mg furosine per 100 g eiwit. Dit komt goed overeen met de furosinegehalten tussen 5 en 7 mg furosine per 100 g eiwit van gepasteuriseerde melk afkomstig uit België en Italië (8,11). De in een eerder onderzoek berekende grenswaarde waaraan de Nederlandse gepasteuriseerde melk zou kunnen voldoen van 7,9 mg per 100 g eiwit (9) is hoger dan de in dit onderzoek berekende grenswaarde van 7,3 mg furosine per 100 g eiwit (= gem.waarde + 3 x sd). Niet duidelijk is in hoeverre het eerste onderzoek representatief is geweest voor de in Nederland geproduceerde melk, aangezien destijds niet alle Nederlandse melkleverende bedrijven zijn meegenomen. De in dit onderzoek berekende grenswaarde van 7,3 mg furosine per 100 g eiwit geeft een betrouwbaarder beeld van de gehele Nederlandse situatie, omdat nu zeker is dat van alle Nederlandse melkleverende bedrijven monsters zijn genomen.

Mogelijk dat het vetgehalte van de melk van invloed is op het furosinegehalte. In tabel 3.1 wordt het gemiddelde furosinegehalte en de bijbehorende standaardafwijking van een aantal (n) gepasteuriseerde melkmonsters per type melk weergegeven.

Tabel 3.1 Het gemiddelde furosinegehalte en standaardafwijking (sd) van (n) halfvolle-(hv), volle - (v) en magere-(m) verse gepasteuriseerde melk.

Soort melk	Furosinegehalte \pm sd (mg/100 g eiwit)	n
m / hv / v	6,1 \pm 0,4	95
m	6,3 \pm 0,2	3
hv	6,0 \pm 0,4	47
v	6,2 \pm 0,4	45

Aan de hand van tabel 3.1 lijkt het alsof het furosinegehalte van de verschillende melksoorten ongeveer hetzelfde is. Uit de toegepaste variantieanalyse (bijlage IV) blijkt dat er wel een significant verschil tussen het furosinegehalte van de verschillende soorten melk is. Met de paarsgewijze vergelijking is bepaald dat er een significant verschil is tussen de melksoorten halfvol en vol. Dit neemt niet weg dat de verschillen in furosinegehalte erg klein zijn.

De verwachting is dat een lager vetgehalte een hoger furosinegehalte geeft. Dit verband is alleen waarneembaar wanneer magere melk met volle en halfvolle melk wordt vergeleken (tabel 3.1). Mogelijk dat de verschillen in vetgehalten tussen halfvolle en volle melk te klein zijn om de warmteoverdracht respectievelijk het furosinegehalte te beïnvloeden. Bovendien kunnen de pasteurisatiecondities van melk verschillen en daarmee het furosinegehalte beïnvloeden.

Mogelijk dat er verschillen zijn in furosinegehalten van de melkmonsters geproduceerd door de vier grote melkleverende bedrijven. Om dit na te gaan worden de onderzochte melkmonsters, waarvan de producent bekend is, onderverdeeld in de vier bekende melkproducenten, gecodeerd A,B,C en D. Het gemiddelde furosinegehalte en de standaarddeviatie van de melk geproduceerd door de vier producenten van verse melk is berekend en worden weergegeven in tabel 3.2.

Tabel 3.2 Het gemiddelde furosinegehalte en standaardafwijking (sd) van (n) verse gepasteuriseerde melk geproduceerd door vier grote zuivelondernemingen: gecodeerd A,B,C en D.

Melkproducent	Furosinegehalte \pm sd (mg/100 g eiwit)	n
A	6,2 \pm 0,3	22
B	6,0 \pm 0,4	17
C	6,0 \pm 0,4	12
D	6,1 \pm 0,5	28

In tegenstelling tot de resultaten van mei en augustus '95 (bijlage I) is er in dit onderzoek geen duidelijk verschil in furosinegehalten van de melk geproduceerd door de verschillende producenten. Dit wordt nog eens bevestigd door de toegepaste variantieanalyse, zie bijlage IV, waaruit blijkt dat er geen significant verschil is in furosinegehalten van de melk geproduceerd door de verschillende melkleverende bedrijven.

Interessant is om te bekijken of er sprake is van een mogelijk effect op het furosinegehalte tussen de combinatie melksoort en producent. Dit wordt nagegaan met meercomponenten variantieanalyse, zie bijlage IVb. Hieruit blijkt dat er geen verband is tussen het furosinegehalte van de melksoort en de producent.

Van magere melk waren weinig monsters zonder toegevoegde droge melkbestanddelen beschikbaar; vaak wordt aan magere melk 1% vetvrije droge melkbestanddelen toegevoegd en dit heeft invloed op het furosinegehalte (10). Enkele monsters magere melk (n = 11) waaraan volgens de ingrediëntendeclaratie 1% magere melkpoeder is toegevoegd zijn onderzocht op het furosinegehalte.

Het gemiddelde furosinegehalte bij dit onderzoek bedraagt 12,3 mg /100g eiwit met een standaarddeviatie van 1,8. Dit is een groot verschil met het furosinegehalte van 6,3 mg / 100 g eiwit van magere melk zonder 1% droge melkbestanddelen. Dit resultaat is in overeenstemming met hetgeen door Resmini en van Renterghem is gevonden, namelijk dat toevoegingen van 1% magere melkpoeder aan te tonen zijn door middel van het furosinegehalte (8,10).

Het laagst gevonden furosinegehalte van melk met toevoeging van 1% magere melkpoeder in dit onderzoek is 9,2 mg per 100 g eiwit, hetgeen hoger is dan de voorlopige grenswaarde van 8,6 mg furosine per 100 g eiwit voor verse gepasteuriseerde melk zonder toevoegingen. De resultaten van de afzonderlijke metingen worden weergegeven in bijlage V .

4. CONCLUSIES

4.1. Conclusies

Furosine lijkt goed toepasbaar als onderzoeksparameter voor de controle van verse gepasteuriseerde peroxidase positieve melk. Geen enkel monster, van de gehele Nederlandse populatie onderzochte verse gepasteuriseerde melk, overschrijdt de voorlopig ingestelde grenswaarde van 8,6 mg furosine per 100 g eiwit. De toevoeging van 1% magere melkpoeder aan verse gepasteuriseerde melk kan door middel van het furosinegehalte worden aangetoond: bij alle onderzochte monsters gepasteuriseerde magere melk, waaraan volgens de ingrediëntendeclaratie 1% droge melkbestanddelen was toegevoegd, wordt de grenswaarde overschreden.

4.2. Aanbevelingen voor verder onderzoek

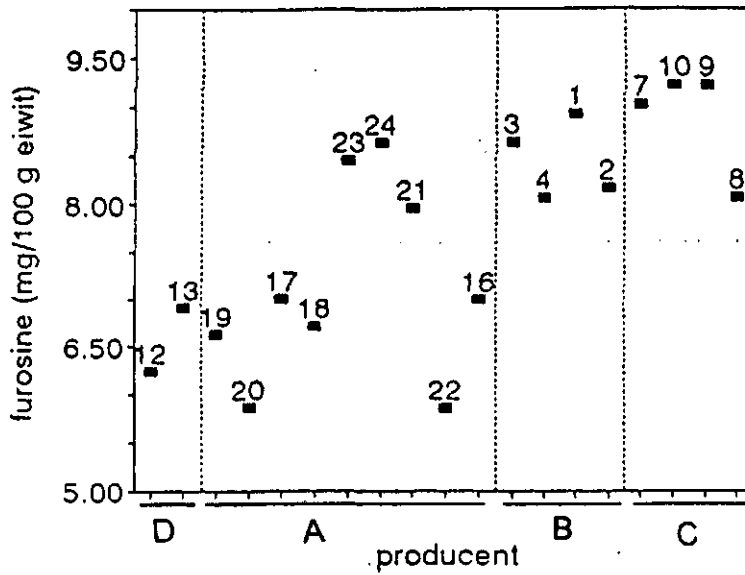
De term "hooggepasteuriseerde melk" is niet expliciet in EU-richtlijn 92/46 gedefinieerd. De tijd/temperatuur combinaties voor de warmtebehandeling hoogpasteurisatie variëren voor de verschillende EU-lidstaten. Binnen de Europese Unie is momenteel een discussie gaande over de terminologie hoogpasteurisatie en over in te stellen grenswaarden voor het furosinegehalte. Het is wenselijk om het furosinegehalte van de Nederlandse hooggepasteuriseerde melk te onderzoeken indien er voorlopige grenswaarden hiervoor worden opgesteld. De Nederlandse delegatie van de EU-werkgroep Zuiveldeskundigen is daarmee beter in staat om zinvol over dit onderwerp te kunnen discussiëren.

LITERATUUR

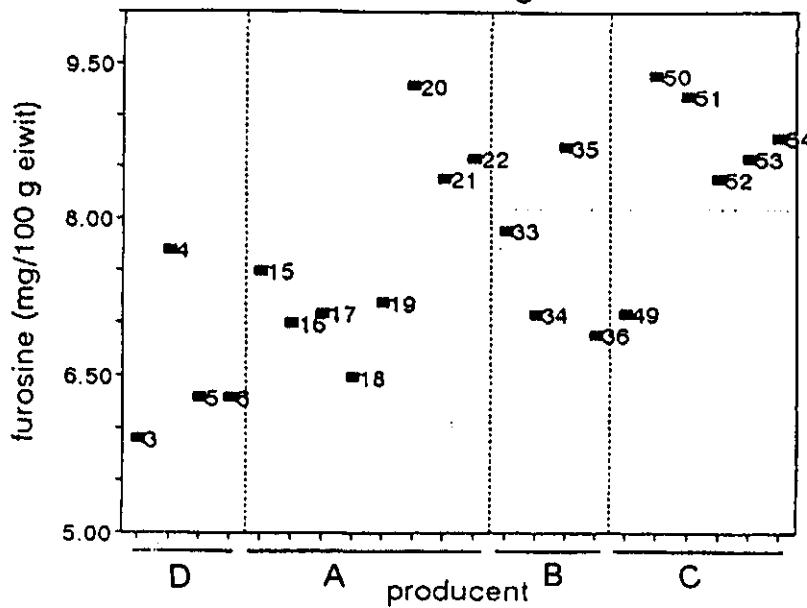
1. VI/CQ/1018/94. Milk and Cheese. Determination of furosine (Σ -furoylmethyllysine) content. Ion-pair Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography method. Italian delegation, Milaan 1994.
2. Finot, P.A and J. Mauron. Le blockage de la lysine par la reaction de Maillard. *Helv. Chim. Acta*, 55, 1153-1164 (1972).
3. IDF 20B:1993. Milk. Determination of nitrogen content. Part I :Kjeldahlmethod. International Dairy Federation, Brussel.
4. Labuza, T. P. and M. Saltmarch. Kinetics of browning and protien qaulity loss in whey powders during the steady state and nonsteady state storage conditions. *J. Dairy Sci.*, 47, 92-113 (1981).
5. NEN 3742 :1994. Melk en vloeibare melkprodukten. Voorbehandeling van het monster voor fysisch en chemisch onderzoek. Nederlands Normalisatie Instituut , Delft.
6. O'Brien, J and P.A. Morrissey. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard brownings reaction in foods. *Crit. Rev. Fd Sci. Nutr.*, 28, 211-250 (1989).
7. Pelligrino L., Influence of fat content on some heat-induced changes in milk and cream. *Netherlands-Milk-and-Dairy-Journal*, 48 : 2, 71-80 (1994).
8. Renterghem van R., and J. de Block. Furosine in consumption milk and milk powders. *Int. Dairy Journal*, 6, 371-382 (1996).
9. Resmini P., Italion delegation working paper, document CHEM/0099/95 (1995) and document CHEM/10195/96 (1996).
10. Resmini ,P., Pelligrino L., and F. Masotti., Evaluation of the extent of the Maillard reaction for the quality control of low-heat-treated dairy product. *IDF seminar special issue 9303*, 153-164 (1993).
11. Resmini, P and L. Pellegrino. Analysis of food heat damage by a direct HPLC method. *Ital. J. Fd. Sci.*, 3, 173-1 83 (1992).
12. Warenwet, band 3, Levensmiddelen, Zuivel (1997)
13. Wijvekate M.L., Verklarende statistiek. Eenentwintigste druk, Aula, Utrecht, 1990.

Het furosinegehalte in mg per 100 g van gepasteuriseerd melk geproduceerd door vier melkleverende bedrijven gecodeerd A,B,C en D. Het onderzoek is uitgevoerd in mei en augustus 1995.

Proef van mei



Proef van augustus



ITALIAN DELEGATION

MILK AND CHEESE DETERMINATION OF FUROSINE (ϵ -FUROYLMETHYL-LYSINE) CONTENT ION-PAIR REVERSE-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

SCOPE

This method specifies a procedure for the quantitative determination of Furosine (ϵ -Furoylmethyl-lysine) in raw or heat-treated milk and in cheese.

REFERENCE

IDF standard 50 B: 1985 - Milk and milk products - Methods of sampling.
ISO standard 707: 1985 - Milk and milk products - Methods of sampling.

DEFINITION

Furosine content in milk or in cheese. The mass fraction of substance determined using the procedure here specified. It is expressed in milligrams per 100 grams protein.

PRINCIPLE

ϵ -lactulosyl-lysine, the first stable Maillard Reaction (M.R.) product formed in milk and in cheese, is partially converted by warm acid-hydrolysis into Furosine, the determination of which allows the extent of early stage of M.R. to be evaluated. The M.R. extent is related to type and intensity of heat-treatments applied both to raw material and in processing.

Determination of Furosine is performed by IP-RP HPLC with U.V. detection at 280 nm. Quantification of Furosine is obtained by reference to standard sample of pure Furosine.

5 REAGENTS

All reagents shall be of recognized analytical grade. Water used must be distilled or of at least equivalent purity unless otherwise specified.

- 5.1 Distilled water.
- 5.2 10.6 N hydrochloric acid (HCl) prepared by mixing 8 volumes of concentrated HCl with 1 volume of water (5.1).
- 5.3 8 N HCl prepared by mixing 2 volumes of concentrated HCl with 1 volume of water (5.1).
- 5.4 3 N HCl prepared by mixing 1 volume of concentrated HCl with 3 volumes of water (5.1).
- 5.5 Methanol.
- 5.6 HPLC elution solvents.
Elution solvents shall be prepared using HPLC-grade reagents.
- 5.6.1 Water.
- 5.6.2 Acetic acid glacial.
- 5.6.3 Potassium chloride (KCl).
- 5.7 Pure Furosine (Neosystem Laboratorie - Rue de Bologne 7, 67100 Strasbourg - France, or other supplier).
- 5.8 Nitrogen for gas-chromatography.

6 APPARATUS

- 6.1 C 18 cartridge (500 mg) for Solid Phase Extraction (SPE).
- 6.2 HPLC equipment provided with gradient pumping system, metal-free injector (20 or 50 µl injection loop) and thermostatic column oven.
- 6.3 U.V. detector operating at 280 nm wavelength with minimum AUFS of 0.010 or lower.
Under the here described chromatographic conditions and for 10 pMoles Furosine injected the signal-to-noise ratio should be higher than 10.
- 6.4 "Furosine dedicated" column from Alltech (Alltech - Europe, Laarne - B) or an equivalent column allowing the Furosine peak to be separated on the baseline and without interferences of other peaks.
- 6.5 Integrator or data reprocessing software capable of peak area measurement.
- 6.6 Sparkling system for HPLC elution solvents.
- 6.7 Analytical balance.
- 6.8 Oven regulated at 110° C.
- 6.9 Screw-cap Pyrex-vials or other heat-resistant sealing vials.
- 6.10 Paper filters, medium grade.
- 6.11 Glass syringe, 5 ml capacity.

6.12 Kjeldahl equipment.

7 SAMPLE PREPARATION

- 7.1 Milk: in a pyrex-vial (6.9) pipette 2 ml and add 6 ml 10.6 N HCl (5.2).
Cheese: in a pyrex-vial (6.9) weigh an aliquot of sample corresponding to 40-50 mg protein and add 8 ml 8 N HCl (5.3).
- 7.2 Bubble up nitrogen (5.8) into the pyrex-vial for about two minutes. Close the pyrex-vial tightly and keep at 110° C for 23 hours into the oven (6.8). After the first hour gently shake the pyrex-vial.
- 7.3 Filter the hydrolysate (7.2) through paper filter (6.10). The filtered hydrolysate can be stored frozen for some months.
- 7.4 Determine the nitrogen content of the filtered hydrolysate (7.3) according to Kjeldahl. Calculate the protein content by multiplying the nitrogen content by 6.38.

8 PREPARATION OF THE STANDARD SAMPLE

- 8.1 Prepare a standard solution of Furosine (5.7) in 3 N HCl (5.4) containing about 1 nMole/ml.
This solution is stable at -20° C.

9 PROCEDURE

- 9.1 **SPE of the filtered hydrolysate (7.3).**
- 9.1.1 Insert the C 18 cartridge (6.1) on the glass syringe (6.11). Pre-wet the cartridge eluting 5 ml methanol (5.5) followed by 10 ml water (5.1). Avoid the cartridge to dry.
- 9.1.2 Load into the syringe 0.5 ml filtered hydrolysate (7.3) and slowly inject into the cartridge discarding the displaced liquid. Avoid air to introduce.
- 9.1.3 Pipette into the syringe 3 ml 3 N HCl. Slowly elute till complete cartridge drying and collect the eluate which must be colourless. The purified hydrolysate is stable at -20° C for one week.
- 9.2 **HPLC determination.**
- 9.2.1 **Chromatographic conditions.**
Solvent A: 0.4% acetic acid in water (v/v).
Solvent B: 0.3% potassium chloride in solvent A (w/v).

Elution gradient:

time (min)	solvent A %	solvent B %
0	100	0
13.5	100	0
20.5	50	50
22.0	50	50
23.0	100	0
32.0	100	0

or equivalent according to the adopted column.

Flow rate: 1.2 ml/min.

Column temperature: at constant value ranging between 30 and 35° C for the "Furosine dedicated" column or differently according to the type of the adopted column.

9.2.2 Equilibration of chromatographic system.

Flush the column with 50:50 = A:B at 1.2 ml/min for few minutes, then set the initial conditions (9.2.1) till a stable baseline is observed.

9.2.3 Perform a blank run injecting 20 µl 3 N HCl (5.4) in order to check purity of the solvents. After final equilibration step the detector response must stabilize to the initial value.

9.2.4 Submit both the purified hydrolysate (9.1.3) and the standard solution (8.1) to chromatographic separation. The Furosine peak must be resolved on the baseline with a retention time ranging from 20 up to 24 min.

10 CALCULATION AND EXPRESSION OF RESULTS

10.1 Determine the Furosine peak area for both purified hydrolysate (9.1.3) and standard solution (8.1) according to baseline integration.

10.2 The furosine amount in the sample, as mg per 100 grams protein, is calculated as follow:

$$Ac \times \frac{Cs}{As} \times \frac{1}{v} \times \frac{6}{0.95} \times \frac{254}{10} \times \frac{8}{m \times 4}$$

where:

- Ac = peak area of Furosine in the sample;
- Cs = amount of injected Furosine in the standard solution, as pMoles;
- As = peak area of Furosine in the standard solution;
- v = injected volume, as μ l;
- 6 = dilution factor involved in the SPE;
- 0.95 = recovery factor of SPE;
- 254 = Furosine molecular weight;
- m = protein content in 2 ml hydrolysate, as mg.

11 PRECISION

Repeatability: the difference between two single results found on identical test material by one analyst using the same apparatus within a short time interval should not exceed 10% of arithmetic mean of the results.

Reproducibility: the difference between two single and independent results obtained by two operators working in different laboratories on identical test material should not exceed 15% of arithmetic mean of the results.

12 BIBLIOGRAPHY

- 12.1 Resmini P., Pellegrino L., Battelli G. - Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by direct HPLC method. *It. J. Food Sci.* 3, 173-183 (1990).
- 12.2 Resmini P., Pellegrino L., Masotti F., Tirelli A., Prati F. - Determinazione del latte in polvere ricostituito nel latte crudo ed in quello pastorizzato, mediante HPLC della furosina. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.* 43, 169-186 (1992).
- 12.3 Resmini P., Pellegrino L., Masotti F. - Evaluation of the Maillard reaction extent for quality control of low-heat treated dairy products. *Proceedings of FIL-IDF Seminar on "Protein and fatglobule modifications by heat-treatment, homogenization and other technological means for high quality dairy products"*. Munich, 25- 28 August 1992.

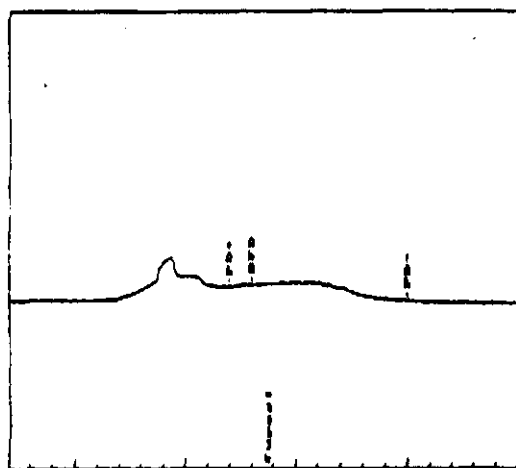
Bijlage IIb Karakteristieke chromatogrammen behorende bij de furosinebepaling.

- A Blanco 3N HCL
- B Standaardoplossing furosine ca. 32 ppm
- C Gepasteuriseerde magere melk: 5,7 mg furosine/100 g eiwit
- D Gepasteuriseerde magere melk met toegevoegd 1% droge melk bestanddelen: 13,5 mg furosine/100 g eiwit.

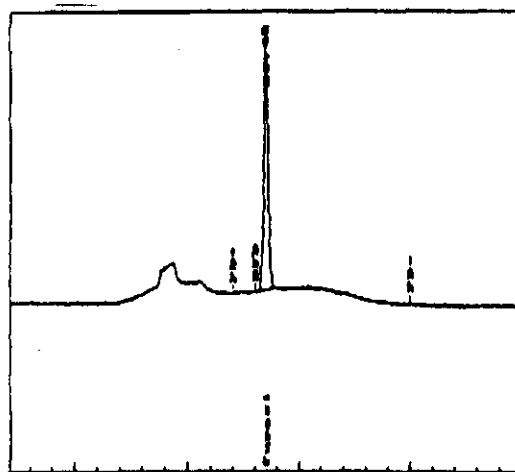
Chromatografische condities:

kolomtemperatuur : 35°C
flow : 1,2 ml/min
UV-detectie : 280 nm
Injectievolume : 50 µl
Analytische kolom : C8, 250 x 4,6 mm; furosine dedicated (Alltech)
Runtijd : 28 min
Loopvloeistoffen : Eluens A= 0,4% azijnzuur/Eluens B= 0,3% KCL in eluens A.

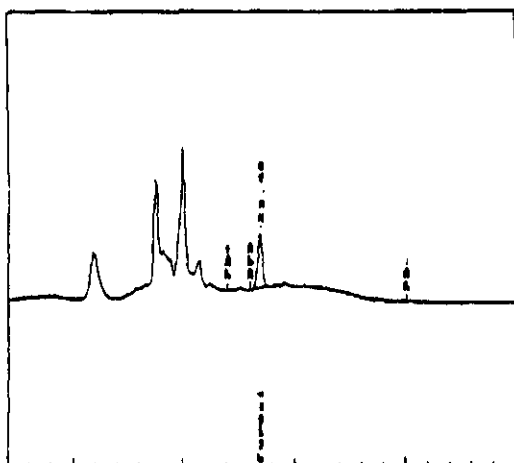
A



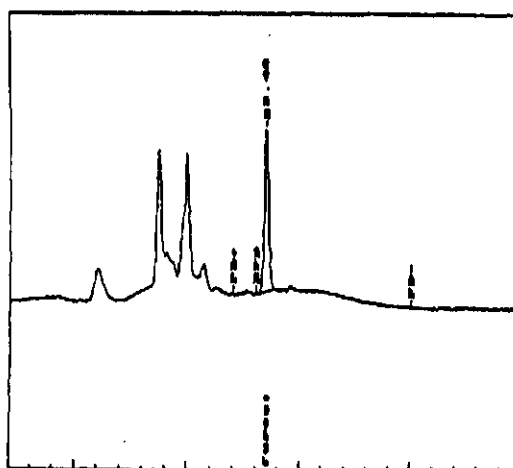
B



C



D



Bijlage III Het furosinegehalte in mg per 100 g eiwit van mager-(m), halfvolle-(hv) en volle-(v) gepasteuriseerde melk geproduceerd door bekende melkverwerkende bedrijven A, B, C en D of onbekend O.

Producent	Soort melk	Furosinegehalte (mg/100 g eiwit)		
		I	II	Gem.
D	v	7,1	7,2	7,2
D	hv	6,0	6,4	6,2
D	hv	5,8	5,4	5,6
D	hv	5,7	5,5	5,6
D	hv	5,7	5,5	5,6
D	v	6,1	6,1	6,1
D	v	5,7	5,9	5,8
D	v	5,7	5,9	5,8
D	v	6,0	6,2	6,1
D	hv	6,1	6,0	6,1
D	hv	7,3	7,3	7,3
D	hv	6,8	6,8	6,8
D	v	6,6	6,7	6,7
D	v	6,2	6,2	6,2
C	v	6,1	6,5	6,3
C	v	6,2	6,3	6,3
C	hv	5,9	6,1	6,0
O	hv	5,7	5,7	5,7
O	v	6,3	6,1	6,2
O	hv	5,8	5,7	5,8
O	hv	6,3	6,1	6,2
O	v	6,5	6,8	6,7
A	v	6,0	6,5	6,3
A	hv	5,9	5,6	5,8
A	hv	5,9	5,9	5,9
A	v	6,0	6,2	6,1
D	v	5,9	6,0	6,0
B	hv	5,7	5,8	5,8
B	hv	5,9	6,0	6,0
B	hv	5,9	6,1	6,0
B	v	6,1	6,2	6,2
B	v	5,7	5,8	5,8
B	v	5,3	5,7	5,5
B	v	5,7	5,5	5,6
B	v	5,8	5,5	5,7
B	v	5,5	6,1	5,8
O	hv	5,7	5,4	5,6
O	v	6,1	6,5	6,3
O	hv	5,9	5,7	5,8
O	v	6,3	5,9	6,1
O	hv	5,7	5,5	5,6
O	v	5,9	5,7	5,8
B	hv	5,7	5,5	5,6
B	hv	6,3	5,7	6,0
B	hv	5,6	5,9	5,8
B	hv	5,6	5,8	5,7
B	v	7,0	6,7	6,9

Bijlage IIIb Het furosinegehalte in mg per 100 g eiwit van mager-(m), halfvolle-(hv) en volle-(v) gepasteuriseerde melk gproduceerd door bekende melkverwerkende bedrijven A, B, C en D of onbekend O.

Producent	Soort melk	Furosinegehalte (mg/100 g eiwit)		
		I	II	Gem.
D	v	5,6	6,2	5,9
D	hv	5,3	5,8	5,6
A	hv	6,0	5,9	6,0
A	v	6,3	6,3	6,3
C	hv	5,8	5,7	5,8
C	h	6,3	6,0	6,2
O	hv	6,6	6,5	6,6
O	hv	6,6	7,0	6,8
O	hv	6,0	6,3	6,2
D	hv	6,8	6,4	6,6
D	v	6,6	6,8	6,7
O	hv	6,2	5,9	6,1
O	v	6,6	6,2	6,4
A	v	6,7	6,5	6,6
A	v	6,3	6,5	6,4
O	v	6,7	7,1	6,9
O	hv	5,7	6,1	5,9
A	v	7,0	6,5	6,8
D	v	6,0	5,6	5,8
D	hv	6,0	5,9	6,0
C	v	5,6	5,8	5,7
C	hv	5,6	5,8	5,7
C	hv	5,7	5,6	5,7
O	hv	5,9	5,6	5,8
O	v	6,1	6,1	6,1
O	hv	6,1	5,7	5,9
O	hv	6,5	6,0	6,3
O	v	6,2	6,7	6,5
B	hv	6,2	5,8	6,0
B	v	6,0	6,1	6,1
B	v	6,9	6,3	6,6
B	hv	6,2	6,0	6,1
B	hv	6,3	6,4	6,4
B	hv	6,1	6,5	6,3
B	v	6,5	6,2	6,4
B	v	6,5	6,4	6,5
O	v	6,7	6,7	6,7
O	hv	5,8	5,9	5,9
O	hv	6,1	6,0	6,1
O	v	6,5	6,5	6,5
O	hv	5,9	6,0	6,0
C	hv	5,6	5,7	5,7
C	hv	5,8	5,6	5,7
C	v	6,8	6,7	6,8
C	v	6,0	6,1	6,1
C	m	6,5	6,2	6,4
C	m	6,5	6,5	6,5
C	m	6,1	6,1	6,1

Bijlage IV Statistische verwerking.

Bij de variantieanalyses wordt gebruik gemaakt van een ANOVA (= analysis of variance) tabel hierin is:

df = vrijheidsgraden

ss = kwadratensom

ms = gemiddelde kwadraten

f = de berekende f-waarde

Voor de theoretische achtergrond en de gebruikte formules wordt verwezen naar "Verklarende Statistiek" van M.L. Wijvekate (13).

Anovatable 1 Variantieanalyse voor de vergelijking van de melksoorten mager, halfvolle en volle melk.

Variatiebron	df	ss	ms	f
Tussen melksoorten	2	1,71	0,854	6,00
Binnen melksoorten	92	13,09	0,142	
Totaal	94	14,79		

De berekende F-waarde is groter dan de kritieke waarde van 3.11 (13, onbetrouwbaarheid van 5 %) hetgeen betekent dat er een significant verschil is tussen het furosinegehalte van de verschillende melksoorten.

Anovatable 2 Variantieanalyse voor de vergelijking van de vier Nederlandse melkproducenten A,B,C en D.

Variatiebron	df	ss	ms	f
Tussen producenten	3	0,38	0,126	0,74
Binnen producenten	64	10,81	0,169	
Totaal	67	11,19		

De berekende F-waarde van 0.74 is kleiner dan de kritieke waarde van 2.38 (13, onbetrouwbaarheid van 5%) hetgeen betekent dat er geen significant verschil is tussen het furosinegehalte van de melk geleverd door de vier producenten.

Bijlage IV b

Anovatablel 3 Variantieanalyse voor de vergelijking van de combinatie melksoort en melkproducent.

Variatiebron	df	ss	ms	ms rest	f
Tussen melksoorten	2	1,04	0,522		3,30
Tussen producenten	3	0,41	0,136		2,76
Interactie combinatie	3	1,13	0,376		2,56
Binnen combinaties	58	8,54	0,147		
Totaal	66	11,12		0,158	

Toetsing van de F-waarde voor de interactie = 2,56 hetgeen kleiner is dan de kritieke waarde 2,77 (13) bij een onbetrouwbaarheid van 5%, hetgeen betekent dat er geen significante interactie aanwezig is tussen melksoort en producent.

Bijlage V Het furosinegehalte in gepasteuriseerde mageremelk waaraan 1% magere melkpoeder is toegevoegd en geproduceerd door bekende melkverwerkende bedrijven A, B C en D of indien onbekend O.

Producent	Furosinegehalte (mg/100 g eiwit)		
	I	II	Gem
A	12,5	11,7	12,1
A	12,9	13,3	13,1
A	12,0	12,5	12,3
B	10,5	9,9	10,2
B	9,4	9,8	9,6
B	9,8	9,2	9,5
B	13,9	13,1	13,5
D	12,8	13,1	13,0
O	13,8	14,4	14,1
O	14,0	14,0	14,0
O	13,5	14,3	13,9

Aantal: 11
 Gem: 12,30
 Sd: 1,76