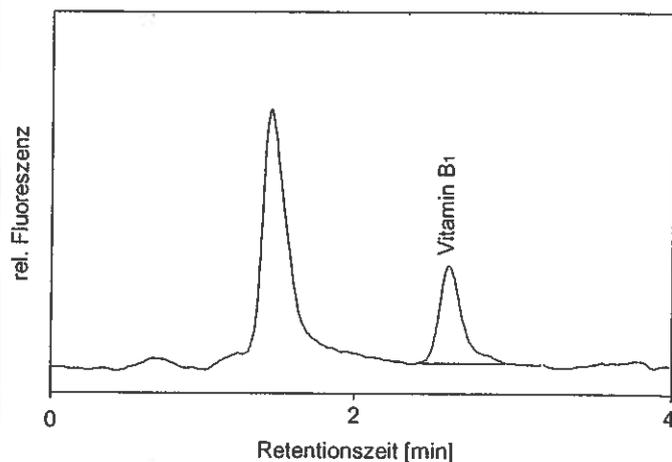


**Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von  
Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und  
mechanischen Behandlungen sowie nach verschiedenen  
langen Belichtungszeiten  
II. Bestimmung des Vitamin B<sub>1</sub> mit Hilfe einer  
neuentwickelten RP-HPLC-Methode**

**E. Tagliaferri (1)  
J.O. Bosset, P. Eberhard,  
U. Bütikofer und R. Sieber(2)**

- 1) Centre de recherche Nestlé  
Division qualité et sécurité alimentaire  
Vers-chez-les-Blanc  
CH-1000 Lausanne 26
- 2) Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM)  
CH-3097 Liebefeld



# Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen sowie nach verschiedenen langen Belichtungszeiten

## II. Bestimmung des Vitamins B<sub>1</sub> mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode\*

Evaluation of Criteria of Milk Deterioration after Various Heat and Mechanical Treatments as well as Light Exposure of Different Durations

## II. Determination of Vitamin B<sub>1</sub> Using a New Developed RP-HPLC Method

*E. Tagliaferri*

Centre de recherche Nestlé, Vers-chez-les Blanc/Lausanne

*J.O. Bosset, P. Eberhard, U. Bütikofer und R. Sieber*  
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft, Liebefeld-Bern  
Technische Assistenz: Doris Fuchs

### Einleitung

In einer ersten Arbeit wurde über die Anwendung der Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure als Kriterium für Veränderungen in der Milch bei verschiedenen technologischen Behandlungen und Lagerungsbedingungen berichtet (1). Es hat sich zwar gezeigt, dass diese Säuren nicht als Indikator, weder für thermische noch für mechanische Behandlungen der Milch, herbeigezogen werden können. Einzig konnte die sehr grosse Empfindlichkeit sowohl der Milch wie der Ascorbinsäure gegen Oxidation und Photooxidation nachgewiesen werden. Für tierische Lebensmittel wird daher oft als Indikatorsubstanz das gut wasserlösliche Thiamin (Vit-

\* Erweiterte Fassung eines an der 103. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Analytische und Angewandte Chemie vorgestellten Posters, Engelberg, 5.-7. September 1991.



Thiochrom wird anschliessend mittels RP-HPLC getrennt und mit Fluoreszenzdetektion quantitativ bestimmt.

### *Analysenmessgeräte*

HPLC-Analysator      Hewlett-Packard 1090M  
 Fluoreszenzdetektor      Hewlett-Packard 1046A

### *Reagenzien*

Thiamin-Mononitrat DAB, Ph.Eur.	Merck Art. 500 980
Kaliumhexacyanoferrat (III) p.A.	Merck Art. 4973
Natriumhydroxid-Plätzchen p.A.	Merck Art. 6498
Natronlauge (1 mol/l) gebrauchsfertig	Siegfried Art. 183 022
ortho-Phosphorsäure 85% p.A.	Merck Art. 573
Salzsäure 37% p.A.	Merck Art. 317
Natriumacetat-Trihydrat p.A.	Merck Art. 6267
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat p.A.	Merck Art. 5099
N,N-Dimethylformamid p.A.	Merck Art. 3053
Methanol für HPLC	Gebr. Mächler Art. 9001
Wasser	Milli-Q-Anlage

### *Wässrige Lösungen*

Salzsäurelösung 1 mol/l: 82 ml konz. 37%ige Salzsäurelösung in einem 1000-ml-Messkolben mit Wasser zur Marke auffüllen.

Natronlauge 150 g/l: 150 g Natriumhydroxid in einem 1000-ml-Messkolben mit Wasser lösen, bis zur Marke auffüllen.

Kaliumhexacyanoferratlösung 10 g/l: 100 mg Kaliumhexacyanoferrat in einem 10-ml-Messkolben mit Wasser lösen, bis zur Marke auffüllen.

Alkalische Kaliumhexacyanoferratlösung: 2 ml der vorgenannten Lösung in einen 50-ml-Messkolben geben, mit Natronlauge (150 g/l) bis zur Marke auffüllen (frisch zubereiten).

Natriumacetatlösung 2,5 mol/l: 34 g Natriumacetat in einem 100-ml-Messkolben lösen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen.

di-Kaliumhydrogenphosphatlösung 10 mmol/l: 2,28 g di-Kaliumhydrogenphosphat in einem 1000-ml-Messkolben mit Wasser lösen, bis zur Marke auffüllen, dann mit 1 mol/l Natronlauge auf pH 7,2 korrigieren.

### *Zubereitung der Standardlösung*

Ca. 10 mg Thiamin-Mononitrat auf 0,01 mg genau in einen 100-ml-Messkolben einwiegen, in Wasser lösen, mit 5 ml Salzsäurelösung (1 mol/l) versetzen und mit Wasser bis zur Marke auffüllen. 5 ml dieser Stammlösung auf 250 ml weiterverdünnen. 5 ml dieser verdünnten Lösung mit 5 ml Salzsäurelösung (1 mol/l) und 5 ml Natriumacetatlösung (2,5 mol/l) in einem 1000-ml-Messkolben versetzen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen.

### *Zubereitung der Probelösung (Hydrolyse)*

50 ml Milch in einen 250-ml-Rundstehkolben pipettieren\* und mit 5 ml Salzsäurelösung (1 mol/l) sowie einigen Siedesteinchen versetzen und während 30 min bei Rückfluss unter gelegentlichem Umschwenken kochen. Diese Lösung nach dem Erkalten in einen 100-ml-Braunglas-Messkolben transferieren, mit 5 ml Natriumacetatlösung (2,5 mol/l) versetzen, mit Wasser bis zur Marke auffüllen. Die so erhaltene Lösung durch einen Rundfilter ( $\varnothing$  15, Schleicher und Schuell Nr. 593) filtrieren.

### *Oxidation des Thiamins zu Thiochrom*

5 ml der oben erwähnten Lösungen (Standard- bzw. Probelösung) in einen 10-ml-Braunglas-Messkolben pipettieren und mit 3 ml alkalischer Kaliumhexacyanoferratlösung während 1,5 min auf einem Reagenzienmischer mischen. Dann 0,45 ml konzentrierte Phosphorsäure (85%) hinzufügen und nach dem Erkalten mit Wasser bis zur Marke ergänzen. Die Standard- bzw. Probelösung noch durch einen Einwegfilter (0,45  $\mu$ m, Scan Art. Nr. 4452) filtrieren.

### *HPLC-Bestimmung*

Einspritzvolumen:	20 $\mu$ l
Vorsäule:	Hypersil ODS 5 $\mu$ m, 20 x 4 mm von Hewlett-Packard (Art. Nr. 799 16KT-120)
Trennsäulen:	Hypersil ODS 5 $\mu$ m, 250 x 4 mm von H.-P. (Art. Nr. 799 26OD-584)
Mobile Phase:	20 v/v % Dimethylformamid (filtriert durch Millipore-Filter FH 0,5 $\mu$ m, Art. Nr. FHLP 04700) in di-Kaliumhydrogenphosphatlösung 10 mmol/l (filtriert durch Millipore-Filter RA 1,2 $\mu$ m, Art. Nr. RAWP 04700). Die FH-Millipore-Filter vor ihrem Gebrauch mit Methanol benetzen.
Fluss:	1,5 ml/min bei Raumtemperatur
Fluoreszenzdetektion:	Excitation bei 368 nm Emission bei 440 nm Gain 16
Cutoff-Filter:	370 nm
Retentionszeit:	ca. 4 min (siehe Abb. 1).

\* Diese Methode ist auch für Joghurt (Probemenge = 50 g auf 0,1 g genau eingewogen) sowie für Käse (Probemenge = 10 g, fein gerieben und durchgemischt, auf 0,1 g genau eingewogen) anwendbar. Bei solchen hochviskosen bzw. pastösen Messgütern müssen noch zusätzlich 20 ml warmes (45–50 °C) Wasser zugefügt werden, um die Salzsäurehydrolyse zu ermöglichen.

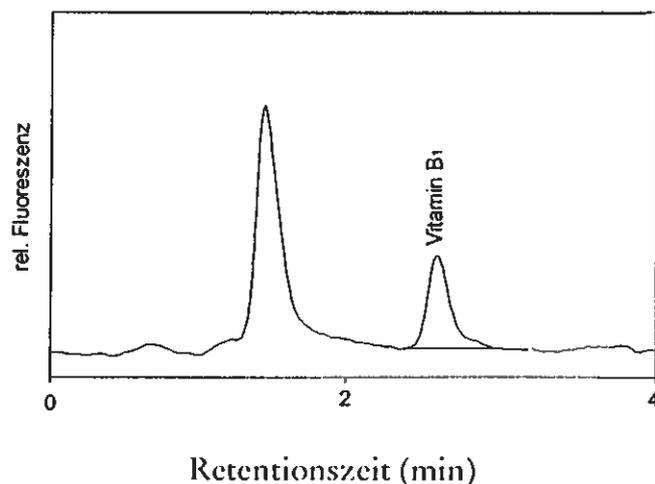


Abb. 1. RP-HPLC-Bestimmung des Vitamins B<sub>1</sub> in Milch als Thiochrom unter Verwendung eines Fluoreszenzdetektors

## Resultate und Diskussion

### *Analytische Aspekte*

Thiamin kann in Lebensmitteln mikrobiologisch, mit Hilfe der Fluorimetrie (2, 7), der Gaschromatographie (8) oder der Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) (6, 9–11) analysiert werden. Eine polarographische Methode zur Bestimmung von Thiamin in Lebensmitteln wurde vorgeschlagen (55).

Bei der mikrobiologischen Bestimmung von Thiamin werden die Mikroorganismen *Lactobacillus viridescens* oder *fermenti* verwendet. Die Reproduzierbarkeit dieser Methode ist jedoch oft ungenügend. Für die Messung der Blindprobe muss noch Thiaminase eingesetzt werden.

Die gebräuchlichste Methode ist die fluorimetrische Messung von Thiochrom nach der Oxidation von Thiamin. Diese Methode ist sehr empfindlich und selektiv. Sie findet allgemein Anwendung für Lebens- und Futtermittel sowie bei der Herstellung von Multivitaminpräparaten. Bei Nahrungsmitteln ist jedoch der Einsatz eines geeigneten Enzyms wichtig, das Phosphatbindungen aufspaltet, um das Thiamin freizusetzen. Produkte, wie z. B. Kakao, die Gerbstoffe enthalten, können die Bildung von Thiochrom stark hemmen (12). Eine vorangehende Trennung mittels Kartuschen mit kationischen Austauschharzen ist deshalb erforderlich. Dabei können auch störende fluoreszierende Komponenten (Interferenzen) entfernt werden.

Die HPLC ist für die Bestimmung von Thiamin und analogen Substanzen gut geeignet. Für die Trennsäule wird meistens eine Umkehrphase verwendet. Der mobilen Phase wird oft ein Ionenpaarreagenz zugesetzt. Voraussetzung ist aber die vorherige Trennung des Thiamins von seinen Derivaten. Die spektrophotometrische Detektion erfolgt bei 254 nm (58). Bei den Lebensmitteln ist sie allerdings

wegen ungenügender Empfindlichkeit und Selektivität nicht empfehlenswert. Die fluorometrische Detektion gibt in den meisten Fällen befriedigende Resultate.

Die Umwandlung in Thiochrom muss vor oder nach der Chromatographie erfolgen. Eine Nachsäulenderivatisierung ist von Vorteil, da der Umwandlungsgrad verbessert und Störungen vermieden werden, aber sie erfordert eine spezielle Apparatur. Bei der hier entwickelten HPLC-Methode wird die Derivatisierung des Thiamins in Thiochrom vor der Chromatographie durchgeführt. Dadurch können die Analysenbedingungen fast gleich gewählt werden wie bei der Bestimmung des Riboflavins (13). Einzig müssen die Excitations- und Emissionswellenlängen anders eingestellt werden. Damit kann auch auf die Zugabe eines Ionenpaarreagens zur mobilen Phase verzichtet werden.

### *Einfluss der thermischen Behandlung*

Wegen seiner Thermolabilität gab das Thiamin in der Milch bereits mehrfach Anlass zu Untersuchungen, die den Einfluss der thermischen Behandlung auf dessen Gehalt zum Ziele hatten. Nach verschiedenen Autoren wird dieses Vitamin bei der Pasteurisierung von Kuhmilch praktisch nicht zerstört. Einzig *Wodsak* (14) hat von Thiaminverlusten berichtet, die höher als 20% waren (Tabelle 1). Bei Muttermilch waren die hitzebedingten Einbussen ebenfalls minimal. Dagegen muss bei Ziegenmilch mit höheren Verlusten gerechnet werden. Auch für die Ultrahocherhitzung sind die Resultate widersprüchlich (Tabelle 2). Wurden in mehreren Arbeiten keine Thiaminverluste festgestellt, haben andere Untersuchungen Rückgänge in der Grössenordnung von etwa 20% nachgewiesen. Dies gilt auch für die Ziegenmilch. Noch bedeutender sind die Thiaminverluste in sterilisierter wie auch in autoklavierter Milch, nicht aber in mikrowellenbehandelter Milch (Tabelle 3).

Eingehende Untersuchungen zum Einfluss der thermischen Behandlung auf den Thiamingehalt der Milch haben *Horak* (39), *Horak* und *Kessler* (43), *Kessler* und *Horak* (44) wie auch *Bayoumi* und *Reuter* (45, 46) durchgeführt. Mit steigender Temperatur und längeren Heisshaltezeiten werden die Thiaminverluste ausgeprägter (Tabelle 4). Aufgrund dieser Ergebnisse ist nach *Horak* (39, 43) die thermisch bedingte Thiaminschädigung als eine Reaktion 2. Ordnung anzusehen. Es wurde dabei eine Aktivierungsenergie für die Thiaminzersetzung von  $101 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  errechnet. Die prozentuale Thiaminschädigung ( $S$ ) kann bei einer absoluten Erhitzungstemperatur  $T$  und einer Heisshaltezeit  $t$  mit folgender Gleichung ermittelt werden:

$$S (\%) = 100 - \frac{100}{1 + t \cdot k} \quad \text{wobei} \quad \left( - \frac{Ea}{2,3 \cdot R \cdot T} + 10,01 \right)$$

$$k = 10$$

$$Ea = 101,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \quad = \text{Aktivierungsenergie}$$

$$R = 8,314 \cdot 10^{-3} \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \quad = \text{universelle Gaskonstante}$$

$$T = \text{Temperatur in Kelvin}$$

$$t = \text{Heisshaltezeit in Sekunden}$$

*Tabelle 1.* Einfluss verschiedener Pasteurisationsbedingungen auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen
	Temp. (°C)	Dauer (s)				
Holmes, 1945 (15)	72-83	22	Thiochrom	0,36	3	n = 20
Chapman, 1957 (16); Ford, 1959 (17)	72	15	Thiochrom	0,46	4	
Nagasawa, 1960 (18)	75	900			≤ 2	
Wodsak, 1960 (14)	Kurzzeitpasteurisation		Thiochrom	0,43	23	
Hostettler, 1965 (19)	85	Durchfluss			≤ 2	
Burton, 1967 (20)	71,7 71,7 85 + 71,7	15 15 2-3 + 15	Thiochrom	0,43 0,43 0,43	8 12 15	1 x Past. 2 x Past.
Blanc, 1980 (21)	72 92	15 20			≤ 2 ≤ 2	
Eitenmiller, 1983 (22); Goldsmith, 1983 (23)	62,5 72 88	1800 15 5	mikrobiell	0,11	5 ≤ 2 3	Muttermilch
Haddad, 1983 (24)	72 80	16 16	Thiochrom	0,20	12 9	
Ford, 1986 (25)	72 82	15 15	mikrobiell		≤ 2 ≤ 2	
Morgan, 1986 (26)	62,5 72 87 88 100	1800 15 15 5 9000	mikrobiell		für sämtliche Varianten ≤ 2	Muttermilch
Lavigne, 1989 (27)	76 81 85 63,5	16 16 4 1800	HPLC	0,58	~8 ~15 ~12 ~21	Ziegenmilch

**Tabelle 2.** Einfluss verschiedener UHT-Verfahren auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungs- methode	Gehalt der Ausgangs- milch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangs- milch)	Bemerkun- gen	
	Temp. (°C)	Dauer (s)					
Bernhard, 1953 (28)	d	150	1	Thiochr.	0,74	16	Ver- gleichs- probe: past.
Chapman, 1957 (16); Ford, 1959 (17)		135	2	fluorom.	0,46	4	
Nagasawa, 1960 (18)		135	2			3	
Lhuissier, 1962 (29)	d			mikrob.	0,5	~20	
Gregory, 1965 (30)	d	127-140	3-15	mikrob.	0,45	≤ 2 (10)	n = 9 (1 Pr.) n = 3
	i	140-150	2,5-4		0,46	≤ 2	
Hostettler, 1965 ()	d	150	2,4			≤ 2	
Lembke, 1968 (31)	d			mikrob.	0,85	12 15 16	6 Verfah- ren direkt
	i				0,80	19 21 27 21	
Ford, 1969 (32)	i	138	2	mikrob.	0,44 0,49	≤ 2 ≤ 2	2 Verfah- ren
Karlin, 1969 (33)					0,57	3	
Rossikhina, 1969 (34)	d	145			0,33	8	
	i					5	
Burton, 1970 (35)	d	144		mikrob.	0,31	≤ 2	O <sub>2</sub> kein Einfluss
	i					141	
Ferretti, 1970 (36)	d	140		fluorom.	0,33	6	1,8% Fett
Thomas, 1975 (37)	i	141	3,6	mikrob.	0,34	≤ 2	
Blanc, 1980 (21)	d	150	2,3			≤ 2	
	i					141	
Görner, 1980 (38)	d	140	3-4	Thiochr.		18	
Horak, 1980 (39)		siehe Tabelle 4		mikrob.	0,32	siehe Tabelle 4	
Haddad, 1983 (24)		140	3,5	Thiochr.	0,20	9	
		110	3,5			7	
Lavigne, 1989 (27)	i	135	4	HPLC	0,58	~20	Ziegen- milch

Abkürzungen: d = direkt; i = indirekt

**Tabelle 3.** Einfluss verschiedener anderer Erhitzungsverfahren auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt der Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen	
		Temp. (°C)					Dauer (s)
Mijll Dekker, 1952 (40)	S			0,31–0,38	21	n = 8	
Bernhard, 1953 (28)	A			Thiochr. 0,74	29	Vergleichsprobe: past. Milch	
Chapman, 1957 (16); Ford, 1959 (17)	S S U + S	111 108		fluorom. 0,46	35 46 46		
Wodsak, 1960 (14)	K A S		300 3600 3600	Thiochr. 0,48 0,49 0,47	16 24 24	n = 4 n = 4 n = 3	
Hostettler, 1965 (19)	S				20		
Burton, 1967 (20)	S P + S P + S	110	1200		0,43 0,43 0,43	33 39 46	24 h Abstand 2 x Past., je 24 h Abstand
Ford, 1967 (41)	S	111	1200	mikrob.	~0,50	~38	Lagerung 3 d: 2 oder 21 °C
Eitenmiller, 1983 (22); Goldsmith, 1983 (23)		100	300	mikrob.	0,11	64	Muttermilch
Heppell, 1983 (42)		121	1200			~60	
Lavigne, 1989 (27)	S	121	900	HPLC	0,58	~31	Ziegenmilch
Demel, 1990 (56)	M				0,40	4	200 ml in 2,5 min auf 96 °C
Sieber, 1992 (57)	M			HPLC	0,20	≤ 2	1000 ml in 11 min auf 78 °C

Abkürzungen: A = Autoklavieren; K = Kochen; M = Mikrowellenerhitzung; P = Pasteurisation; S = Sterilisation; U = UHT

Tabelle 4. Thiaminverluste in UHT-Milch nach verschiedenen Temperatur-Zeit-Bedingungen (39)

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Thiaminverluste (%)
120	0 50 100 200 400 1000 3000 5000	≤2 ≤2 ≤2 3 16 28 50 59
130	0 20 50 100 200 500 1000 2000 5000	≤2 ≤2 ≤2 10 10 26 39 58 81
140	0 50 100 300 600 1000 1500 2000 3000	≤2 8 13 26 46 62 69 74 82
150	0 20 50 100 300 600 1000	≤2 3 10 28 49 62 74

*Bayoumi* und *Reuter* (45, 46) haben demgegenüber Milch bei 7 abgestuften Erhitzungstemperaturen (von 120 bis 150 °C) und -zeiten (von 2 bis 32 s) sowohl direkt als auch indirekt erhitzt. Die berechnete Aktivierungsenergie für den Thiaminabbau liegt mit  $95 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  in dem von *Horak* ermittelten Bereich. Nach diesen Autoren (45, 46) kann die Thiaminzersetzung im Bereich des Ultrahocherhitzens der Milch als Reaktion 1. Ordnung beschrieben werden, was nach *Horak* und *Kessler* (43) für höhere Temperatur-/Zeit-Bedingungen nicht mehr zutrifft.

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Resultate ergaben keine nennenswerten Thiaminverluste weder in pasteurisierter noch in ultrahocherhitzter Milch (Abb. 2) und bestätigen so die Mehrheit der in der Literatur erwähnten Ergebnisse.

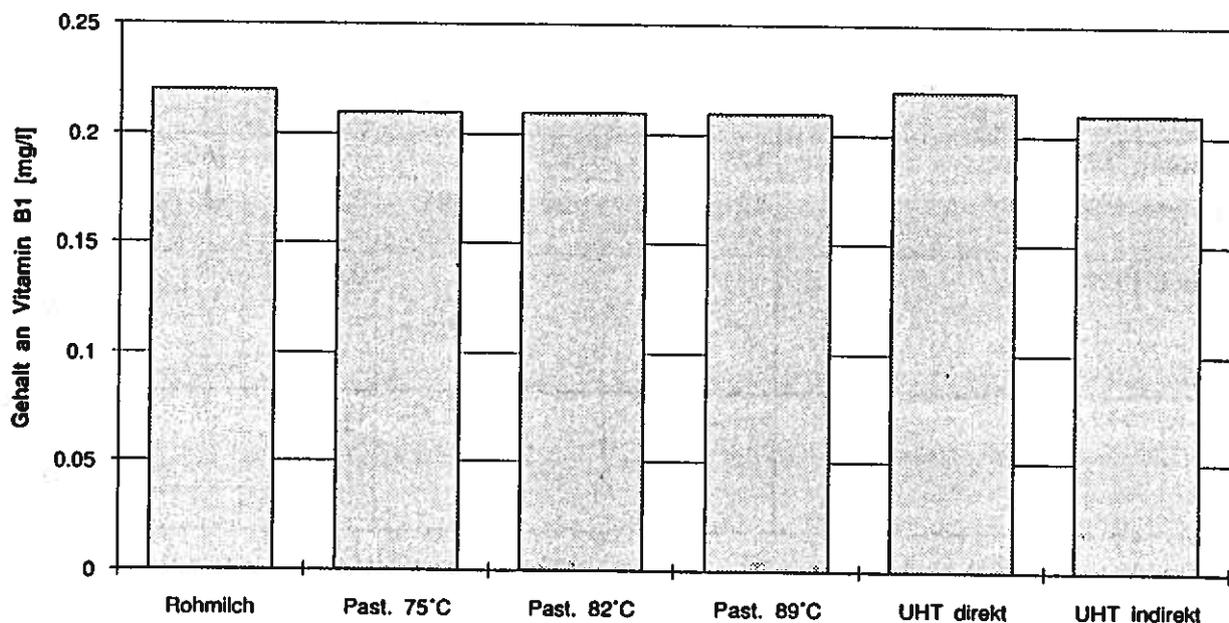


Abb. 2. Einfluss der thermischen Behandlung der Milch auf ihren Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt

### *Einfluss der Lagerungsdauer*

Die Angaben in der Literatur über die Thiaminverluste während der Lagerung von ultrahocherhitzter Milch sind wiederum unterschiedlich. Dabei spielen neben der Dauer auch die angewendeten Temperaturen eine wichtige Rolle. Während beim Tiefgefrieren beispielsweise ein Anstieg der Thiaminmenge angegeben wird (22–24), sind die Verluste bei Kühlschrankschranktemperaturen mit Ausnahme der Angaben von *Kneifel* und *Sommer* (47) minim. Bei Raumtemperatur hingegen werden die Abnahmen in Abhängigkeit der Dauer erheblich grösser (Tabelle 5). *Fink* (49) hat die von *Horak* (39) durchgeführten Untersuchungen zur Reaktionskinetik der erheizungsbedingten Veränderungen auf die Lagerung von UHT-Milch ausgeweitet. Danach lässt sich die prozentuale Thiaminabnahme in gelagerter UHT-Milch über den breiten Temperaturbereich von 0 bis 150 °C bei Erheizungs- bzw. Lagerungszeiten von Sekunden bis zu Monaten mit der von *Horak* (39) ermittelten Gleichung berechnen. So verursacht eine UHT-Behandlung bei 140 °C während 22 s einen vergleichbaren Thiaminverlust wie eine Lagerung bei 20 °C während 6 Wochen.

### *Einfluss des Sauerstoffs*

Über die Einwirkung des Sauerstoffs auf den Thiamingehalt von Milch sind nur wenige Angaben in der Literatur vorhanden. Nach *Burton* et al. (35) beeinflusst Sauerstoff bei der Ultrahocherhitzung den Thiamingehalt der Milch nicht (Tabelle 2). *Thomas* et al. (37) wie auch *Mohammed* et al. (51) beobachteten hingegen einen relativ kleinen Einfluss des Sauerstoffs auf den Thiamingehalt (Tabelle 5). *Fink* (49) hat den Einfluss des in der UHT-Milch gelösten Sauerstoffs auf den Thiamingehalt anhand von direkt erhitzter (entgaster) und indirekt erhitzter (nicht entgaster) UHT-Vollmilch ohne Kopfraumvolumen wie auch von indirekt erhitzter (nicht entgaster) UHT-Vollmilch mit und ohne Kopfraumvolumen untersucht. Zwischen direkt und indirekt erhitzter Milch unterschieden sich die Verluste bei gleicher Lagerungszeit und -temperatur nicht signifikant voneinander. Dies gilt auch bei Anwesenheit von Luftsauerstoff in Form eines Kopfraumvolumens bei konstanter Lagerungstemperatur.

### *Einfluss der Licht- und $\gamma$ -Bestrahlung*

Über den Einfluss der Belichtung auf den Thiamingehalt der Milch liegen in der Literatur nur wenige Angaben vor, die wiederum widersprüchlich sind (Tabelle 6). Hatte *Ford* (41) bei einer Belichtung von sterilisierter Milch mit Sonnenlicht noch keine Verluste festgestellt, berichteten *Ferretti* et al. (36) über geringfügige Verluste in UHT-Milch, die während 90 Tagen bei indirektem Licht gelagert wurden. Diese lichtbedingten Verluste sind im Vergleich zu einer Lagerung im Dunkeln mit etwa 10% zu beziffern. Demgegenüber haben *Mohammad* et al. (51) bei einer 6stündigen Aufbewahrung von roher Milch unter Fluoreszenz- wie auch unter Sonnenlicht

*Tabelle 5.* Einfluss der Lagerung auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt von roher, pasteurisierter, ultrahoherhitzter und sterilisierter Milch

Erstautor, Jahr	Milch	Lagerungsbedingungen		Verpackung	Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen
		Temp. (°C)	Dauer (d)					
Mijll Dekker, 1952 (40)	s	Raumtemp. 37	180	Glas weiss			~10 ~20	im Dunkeln
Lembke, 1968 (31)	Ud		28		mikrob.	0,70	7 7 9	6 Verfahren direkt
	Ui		28			0,64	11 14 15 7	
Ford, 1969 (32)	Ui Ud	15-19	90	Karton	mikrob.	0,48 0,48 0,59	≤ 2 8 27	für Ud Bezugsbasis: rohe Milch
Ferretti, 1970 (36)	U	5 20 37	30		fluorom.		≤ 2 ≤ 2	Aufbewahrung im Dunkeln
		5 20 37	90				13 3 26 16	
Thomas, 1975 (37)	Ui	23	62		mikrob.	0,34 0,35	7 ≤ 2	8,4 ppm O <sub>2</sub> <1 ppm O <sub>2</sub>
Görner, 1980 (48)	Ui	6 20-25 37	79		Thiochr.		~10 ~19 ~40	
Eitenmiller, 1983 (22); Goldsmith, 1983 (23)		-20	14 28		mikrob.	0,11	Anstieg um 26%	Muttermilch
Haddad, 1983 (24)	p/U	-40	14	amber Polyethylen	fluorom.		Anstieg um 8-19%	
Fink, 1984 (49)	Ui	4 20 35 50	133		mikrob.	0,35	11 14 60 83	x Probe 20 °C nach 108 Tagen 17%
	Ud	4 20 35 50					9 0 <sup>x</sup> 43 83	
Kneifel, 1986 (47)	Ui	5 20	140	Karton	HPLC	0,34	56 71	Basis: frische Milch
Flückiger, 1989 (50)	Udi s	5 25	224					zu grosse Streuung
Lavigne, 1989 (27)	p Ui	7	21	Plastikb. + Alufolie	HPLC		~10 ~10	unter Luft unter Vakuum
Mohammad, 1990 (51)	K S Z B	Dunkel	6h	«opaque container»		0,38	11 3 7 ≤ 2 8 3 10 6	1. Reihe mit O <sub>2</sub> 2. Reihe ohne O <sub>2</sub>
Dolfini, 1991 (52)	Ud	5 20	90	Karton		3,2 3,0	Anstieg um bis zu 20%	B <sub>1</sub> zugesetzt
	Ui	5 20	90					

Abkürzungen: K = Kuhmilch; S = Schafmilch; Z = Ziegenmilch; B = Büffelmilch; r = roh; p = pasteurisiert; U = UHT; d = direkt; i = indirekt; s = sterilisiert

Tabelle 6. Einfluss von Licht und  $\gamma$ -Bestrahlung auf den Vitamin-B<sub>1</sub>-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Milch	Verpackung	Lichttyp	Bedingungen		Gehalt Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (%)	Bemerkungen
				Dauer	Temp. (°C)			
Mijll Dekker, 1952 (40)	s	Glas weiss	diffuses Licht	180d	Raumtemp.		~10	
Ford, 1966 (54)	r		$\gamma$ -Bestrahlung	0,25 0,5 1,0 Mrad		0,34	75 84 92	fluorometr.
Ford, 1967 (41)	s		Sonnenlicht	8h		~0,35	≤ 2	
Ferretti, 1970 (36)	Ud		indirektes Licht	30d 90d	20 37 20 37		19 16 35 29	
Mohammad, 1990 (51)	K	«opaque container»	Fluoreszenzl. Sonnenlicht	6h		0,38	32 11	1. Reihe mit O <sub>2</sub> 2. Reihe ohne O <sub>2</sub>
	S					0,85	40 24	
	Z					0,40	33 12	
	B						44 18	
							28 8	
							33 8	
						0,53	32 10	
							40 15	

Abkürzungen: siehe Tabelle 5

Thiaminverluste von bis zu 40% angegeben, wenn gleichzeitig noch Sauerstoff vorhanden war. Dabei erzeugte bereits die Aufbewahrung der Milch im Dunkeln Verluste von etwa 10%. Bei Abwesenheit von Sauerstoff waren die Verluste geringer. Die gleiche Beobachtung wurde von diesen Autoren (51) auch in Schaf-, Ziegen- und Büffelmilch gemacht (Tabelle 6). Die Einwirkung einer  $\gamma$ -Bestrahlung auf den Thiamingehalt der Milch haben *Ford et al.* (54) untersucht. Sie stellten dabei Verluste fest, die ausgeprägter waren als diejenigen beim Sterilisieren und Autoklavieren (Tabelle 3).

### Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit schlägt eine neue quantitative RP-HPLC-Bestimmung des Vitamins B<sub>1</sub> der Milch vor. Diese neue Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Analysenmethoden. Sie ist schnell, sehr empfindlich (Nachweisgrenze: 20 µg/kg für ein chromatographisches Signal-/Rauschpegel-Verhältnis von 3), reproduzierbar (ca. ± 10%) und in Milch frei von Interferenzen und Artefakten. Mit kleinen Änderungen kann diese Methode auch für andere Milchprodukte wie Joghurt und Käse angewendet werden.

Bei den Bedingungen des Pasteurisierens und der Ultrahoherhitzung liegen die Thiaminverluste in der Mehrzahl der Untersuchungen unter 10%, was ungefähr

dem üblichen analytischen Messfehler entspricht. Dagegen nimmt Thiamin in gekochter und sterilisierter Milch viel stärker ab. Die geringfügigen Thiaminverluste während der Lagerung von Milch sind abhängig von den angewendeten Temperatur- und Zeit-Bedingungen und sollten wiederum unter Berücksichtigung der analytischen Messfehler interpretiert werden. Sauerstoff wie auch eine Belichtung der Milch beeinflussen den Thiamingehalt nicht allzu stark. Das Vitamin B<sub>1</sub> ist deshalb kein geeignetes Kriterium zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen.

### *Dank*

Die Autoren danken allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der FAM und Nestec SA, die an dieser Untersuchung teilgenommen haben, für ihre wertvolle Arbeit. Herrn Dr. *M. van Schothorst*, Chef der Division qualité et sécurité alimentaire du Centre de recherche Nestlé, sind wir für sein Interesse an dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

### *Zusammenfassung*

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer neuen Bestimmungsmethode für das Vitamin B<sub>1</sub> in Milch und Milchprodukten nach einer sauren Hydrolyse der Proben. Das freigesetzte Thiamin wird dabei im alkalischen Milieu zu Thiochrom oxidiert, das dann nach einer Trennung mit Hilfe der RP-HPLC fluorometrisch bestimmt wird. Als zweites Ziel wurde das Verhalten dieses Vitamins als eventuelles Kriterium für Veränderungen der Milch studiert, die verschiedenen thermischen Behandlungen wie Pasteurisation bei 75, 82 und 89 °C, UHT direkt und indirekt unterworfen wurde. Bei der Reproduzierbarkeit der vorgeschlagenen Methoden ( $\pm 10\%$ ) ergaben diese thermischen Behandlungen keine signifikanten Verluste des Vitamins B<sub>1</sub>. Deshalb ist das Thiamin kein geeignetes Kriterium für technologisch bedingte Veränderungen. Diese Resultate bestätigen übrigens die in der Literatur vorhandenen Befunde. Die kurze bibliographische Übersicht als drittes Ziel dieser Arbeit zeigte auf, dass nur stärkere thermische Behandlungen wie Kochen, Sterilisieren oder Autoklavieren sowie gewisse Lagerungsbedingungen zu ausgeprägten Vitamin-B<sub>1</sub>-Verlusten in der Milch führen können. Der Einfluss von Licht und Sauerstoff während der Lagerung der Milch kann als vernachlässigbar angesehen werden.

### *Résumé*

Le premier objectif du présent travail est la mise au point d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine B<sub>1</sub> dans le lait et les produits laitiers en général après une hydrolyse acide de l'échantillon. La thiamine ainsi libérée est alors oxydée en milieu alcalin jusqu'au thiochrome, qui peut être dosé par fluorimétrie après une séparation par RP-HPLC. Son deuxième objectif est l'étude de cette vitamine en tant que critère éventuel de l'altération du lait soumis à divers traitements thermiques tels que pasteurisations à 75, 82 et 89 °C, UHT direct et UHT indirect. A la reproductibilité près du dosage proposé, soit environ  $\pm 10\%$ , aucune perte significative n'a pu être mise en évidence par suite de tels traitements. Ces résultats confirment d'ailleurs ceux trouvés dans la littérature dans le cadre d'une brève revue

bibliographique, troisième et ultime objectif du présent travail. Dans son ensemble, cette dernière indique en effet que seuls des traitements thermiques plus intenses tels que stérilisations, cuissons ou autoclavages, de même que certains stockages peuvent causer des pertes sensibles en vitamine B<sub>1</sub> du lait. De plus, l'influence de la lumière et de l'oxygène au cours du stockage du lait peut être considérée comme insignifiante.

### *Summary*

The first purpose of this work was to develop a new method for the determination of vitamin B<sub>1</sub> in milk and milk products after acid hydrolysis of the samples. The thiamine thus liberated is oxidized into thiochrome in an alkaline medium. After separation by RP-HPLC, the thiochrome is determined by fluorometry. Its second purpose was to study the behaviour of this vitamin as a possible criterion for deteriorations of milk subjected to different heat treatments such as pasteurization at 75, 82 and 89 °C as well as UHT direct and indirect. No significant loss of vitamin B<sub>1</sub> due to these heat treatments was observed, the reproducibility of the proposed method being approximately  $\pm 10\%$ . These results confirm those found in the literature. A review, as the third objective of this paper, shows that only more drastic heat treatments like sterilization, boiling or autoclaving and certain storage conditions can lead to marked vitamin B<sub>1</sub> losses in milk. The influence of light and oxygen during storage of milk can be neglected.

### *Literatur*

1. *Bosset, J.O., Eberhard, P., Bütikofer, U., Sieber, R. et Tagliaferri, E.*: Evaluation de quelques critères d'altération du lait entier soumis à divers traitements thermiques et mécaniques ainsi qu'à diverses durées d'exposition à la lumière. Partie I. Étude de la vitamine C. *Trav. chim. aliment. hyg.* **82**, 433–456 (1991).
2. *Gubler, C.J.*: Thiamin. In: Machlin, L.J., *Handbook of vitamins. Nutritional, biochemical, and clinical aspects*, pp. 245–297. M. Dekker, New York, Basel 1984.
3. *Renner, E.*: *Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen*. Volkswirtschaftlicher Verlag, München 1982.
4. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung*: *Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr*. 5. überarbeitete Auflage. Umschau Verlag, Frankfurt 1991.
5. *NN*: *Milchstatistik der Schweiz 1990*. Statistische Schriften Nr. 160. Schweiz. Bauernsekretariat, Brugg 1991.
6. *Kneifel, W. und Sommer, R.*: Bestimmung von Thiamin in Milch und Milchprodukten mittels HPLC. *Ernährung* **10**, 459–464 (1986).
7. *Kon, S.K. and Thompson, S.Y.*: Measurement of vitamins in the control of milk processing. *Milchwissenschaft* **5**, 166–173 (1957).
8. *Echols, R.E., Miller, R.H. and Foster, W.*: Analysis of thiamine in milk by gas chromatography and the nitrogen-phosphorus detector. *J. Dairy Sci.* **69**, 1246–1249 (1986).
9. *Brubacher, G., Müller-Mulot, W. and Southgate, D.A.T.*: *Methods for the determination of vitamins in food*. Elsevier Applied Science Publ. London, New York 1985.
10. *Nicolas, E.C. and Pfender, K.A.*: Fast and simple liquid chromatographic determination of nonphosphorylated thiamine in infant formula, milk, and other foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **73**, 792–798 (1990).

11. *Fox, J.B., Ackerman, S.A. and Thayer, D.W.*: Fluorometric determination of thiamine vitamers in chicken. *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* **75**, 346–354 (1992).
12. *Tagliaferri, E.*: unveröffentlichte Resultate (1992).
13. *Tagliaferri, E., Sieber, R., Bütikofer, U., Eberhard, P. und Bosset, J.O.*: Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen sowie nach verschiedenen langen Belichtungszeiten. III. Bestimmung des Vitamins B<sub>2</sub> mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* (im Druck).
14. *Wodzak, W.*: Die Haltbarkeit der Vitamine der Milch beim Pasteurisieren, Sterilisieren und bei der Herstellung von Kondensmilch. *Nahrung* **4**, 209–224 (1960).
15. *Holmes, A.D., Lindquist, H.G., Jones, C.P. and Wertz, A.W.*: Effect of high-temperature-short-time pasteurization on the ascorbic acid, riboflavin and thiamin content of milk. *J. Dairy Sci.* **28**, 29–33 (1945).
16. *Chapman, H.R., Ford, J.E., Kon, S.K., Thompson, S.Y., Rowland, S.J., Crossley, E.L. and Rothwell, J.*: Further studies of the effect of processing on some vitamins of the B complex in milk. *J. Dairy Res.* **24**, 191–197 (1957).
17. *Ford, J.E., Kon, S.K. and Thompson, S.Y.*: Effects of processing on vitamins of the B-complex in milk. *XV. Int. Dairy Congr.* **1**, 429–434 (1959).
18. *Nagasawa, T., Tanahashi, T., Kuzuya, Y. and Shigeta, N.*: Effect of ultra-high-temperature treatment on some vitamins in milk. 2. Destruction of thiamine and riboflavin. *Jap. J. zootech. Sci.* **31**, 200–203 (1960), zit. *Dairy Sci. Abstr.* **23**, 190 (1961).
19. *Hostettler, H.*: Der Einfluss der Ultra-Hoch-Temperatur (UHT)-Sterilisation auf die Proteine und Vitamine der Milch. *Mitt. Gebiete Lebensm. Unters. Hyg.* **56**, 137–144 (1965).
20. *Burton, H., Ford, J.E., Franklin, J.G. and Porter, J.W.G.*: Effect of repeated heat treatments on the levels of some vitamins of the B-complex in milk. *J. Dairy Res.* **34**, 193–197 (1967).
21. *Blanc, B.*: Einfluss der thermischen Behandlung auf die wichtigsten Milchinhaltsstoffe und auf den ernährungsphysiologischen Wert der Milch. *Alimenta Sonderausgabe* 5–25 (1980).
22. *Eitenmiller, R.R., Goldsmith, S.J., Barnhart, H.M. and Toledo, R.T.*: Effects of processing and storage on protective factors and water soluble vitamins in human milk. *Res. Food Sci. Nutr.* **3**, 23–24 (1983).
23. *Goldsmith, S.J., Eitenmiller, R.R., Toledo, R.T. and Barnhart, H.M.*: Effects of processing and storage on the water-soluble vitamin content of human milk. *J. Food Sci.* **48**, 994–995, 997 (1983).
24. *Haddad, G.S. and Loewenstein, M.*: Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.* **66**, 1601–1606 (1983).
25. *Ford, J.E., Schröder, M.J.A., Bland, M.A., Blease, K.S. and Scott, K.J.*: Keeping quality of milk on relation to the copper content and temperature of pasteurization. *J. Dairy Res.* **53**, 391–406 (1986).
26. *Morgan, J.N., Toledo, R.T., Eitenmiller, R.R., Barnhart, H.M. and Maddox, F.*: Thermal destruction of immunoglobulin A, lactoferrin, thiamin and folic acid in human milk. *J. Food Sci.* **51**, 348–352 (1986).
27. *Lavigne, C., Zee, J.A., Simard, R.E. and Béliveau, B.*: Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and C and on the shelf-life of goat's milk. *J. Food Sci.* **54**, 30–34 (1989).

28. *Bernhard, K., Gschaedler, L. und Sarasin, A.*: Die biologische Wertigkeit der uperisierten (= ultrapasteurisierten) Milch. Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss. 9, 312–324 (1953).
29. *Lhuissier, M., Hugot, D. et Biette, E.*: Étude vitaminologique du lait «uperisé». Rev. Lait. Franc. 319–320 (194) (1962).
30. *Gregory, M.E. and Burton, H.*: The effect of ultra-high-temperature heat treatment on the content of thiamine, vitamin B<sub>6</sub> and vitamin B<sub>12</sub> of milk. J. Dairy Res. 32, 13–17 (1965).
31. *Lembke, A., Frahm, H. und Wegener, K.H.*: Ernährungsphysiologische Untersuchungen zur Ultrahocherhitzung der Milch. Kieler Milchwirt. Forschungsber. 20, 331–342 (1968).
32. *Ford, J.E., Porter, J.W.G., Thompson, S.Y., Toothill, J. and Edwards-Webb, J.*: Effect of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk. J. Dairy Res. 36, 447–454 (1969).
33. *Karlin, R.*: Sur la teneur en folates des laits de grand mélange. Effets de divers traitements thermiques sur les taux de folates, B<sub>12</sub> et B<sub>6</sub> de ces laits. Int. Z. Vitaminforsch. 39, 359–371 (1969).
34. *Rossikhina, G.A., Mastakov, N.N. and Seleznev, V.I.*: [Effect of UHT treatment of milk on vitamin content]. Moloch. Prom. 30, 21–22 (1969), zit. Dairy Sci. Abstr. 31, 532 (1969).
35. *Burton, H., Ford, J.E., Perkin, A.G., Porter, J.W.G., Scott, K.J., Thompson, S.Y., Toothill, J. and Edwards-Webb, J.*: Comparison of milks processed by the direct and indirect methods of ultra-high-temperature sterilization. IV. The vitamin composition of milks sterilized by different processes. J. Dairy Res. 37, 529–533 (1970).
36. *Ferretti, L., Lelli, M.E., Miuccio, C. e Ragni, C.*: Variazioni quantitative di alcune vitamine nel latte U.H.T. durante la conservazione. Quad. Nutr. 30, 124–133 (1970).
37. *Thomas, E.L., Burton, H., Ford, J.E. and Perkin, A.G.*: The effect of oxygen content on flavour and chemical changes during aseptic storage of whole milk after ultra-high-temperature processing. J. Dairy Res. 42, 285–295 (1975).
38. *Görner, F. und Uherova, R.*: Retention von einigen Vitaminen während der Ultrahocherhitzung von Milch. Nahrung 24, 713–718 (1980).
39. *Horak, F.P.*: Über die Reaktionskinetik der Sporenabtötung und chemischer Veränderungen bei der thermischen Haltbarmachung von Milch zur Optimierung von Erhitzungsverfahren. Diss. Techn. Univ. München 1–141 (1980).
40. *Mijll Dekker, L.P. van der and Engel, C.*: The vitamin A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and C contents of bottled sterilized milk during storage under various conditions. Neth. Milk Dairy J. 6, 104–108 (1952).
41. *Ford, J.E.*: The influence of the dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and during subsequent exposure to sunlight. J. Dairy Sci. 34, 239–247 (1967).
42. *Heppell, L.M.J., Ford, J.E. and Kilshaw, P.J.*: Effects of heat treatment of milk on its allergenicity and nutritional quality. Proc. Nutr. Soc. 42, 18A (1983).
43. *Horak, F.P. und Kessler, H.G.*: Thermische Thiaminschädigung – Eine Reaktion 2. Ordnung. Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 173, 1–6 (1981).
44. *Kessler, H.G. und Horak, P.*: Objektive Beurteilung der UHT-Milcherhitzung durch Normierung bakteriologischer und chemischer Effekte. Milchwissenschaft 36, 129–133 (1981).
45. *Bayoumi, E.S. und Reuter, H.*: Vitamin-B<sub>1</sub>-Abbau während der UHT-Erhitzung von Vollmilch. Milchwissenschaft 35, 278–279 (1980).
46. *Bayoumi, E.S. und Reuter, H.*: Vitamin-B<sub>1</sub>-Abbau während der UHT-Erhitzung von Vollmilch. Milchwissenschaft 40, 713–716 (1985).

47. *Kneifel, W. und Sommer, R.*: Zum lagerungsbedingten Abbau einiger wasserlöslicher Vitamine in Haltbarmilch. *Oest. Milchwirt.* 41 (WB 10), 79–87 (1986).
48. *Görner, F. und Uherova, R.*: Vitaminveränderungen der I-I-Milch während der Lagerung. *Nahrung* 24, 373–379 (1980).
49. *Fink, R.*: Über lagerungsbedingte Veränderungen von UHT-Vollmilch und deren reaktionskinetische Beschreibung. Diss. Techn. Univ. München 1–157 (1984).
50. *Flückiger, E., Rüegg, M., Steiger, G., Lavanchy, P., Blanc, B. und Cerf, O.*: Einfluss von Rohmilchqualität, Erhitzungsverfahren und Lagerungsbedingungen auf Qualitätsmerkmale von UHT-Milch und in Flaschen nachsterilisierter Milch. *Schweiz. Milchw. Forschung* 18, 3–12 (1989).
51. *Mohammad, K.S., Al-Thalib, N.A. and Al-Kashab, L.A.*: Some water-soluble vitamins in different types of milk and their stabilities towards light and oxygen. *Egypt. J. Dairy Sci.* 18, 37–44 (1990).
52. *Dolfini, L., Kueni, R., Eberhard, P., Fuchs, D., Gallmann, P.U., Strahm, W. und Sieber, R.*: Über das Verhalten von zugesetzten Vitaminen während der Lagerung von UHT-Magermilch. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 82, 187–198 (1991).
53. *Kessler, H.G. and Fink, R.*: Changes in heated and stored milk with an interpretation by reaction kinetics. *J. Food Sci.* 51, 1105–1111 (1986).
54. *Ford, J.E., Gregory, M.E. and Thompson, S.Y.*: The effect of gamma irradiation on the vitamins and proteins of liquid milk. XVI. *Int. Dairy Congr. A*, 917–923 (1966).
55. *NN*: Polarographische Bestimmung von Thiamin (Vitamin B<sub>1</sub>). *Application Bulletin* 218/1, Methrom, Herisau 1992.
56. *Demel, S., Steiner, I., Washüttl, J. und Kroyer, G.*: Chemische und mikrobiologische Untersuchungen an mikrowellenbehandelter Milch. *Z. Ernährungswiss.* 29, 299–303 (1990).
57. *Sieber, R., Eberhard, P. und Strahm, W.*: Mikrowellenerhitzung von Milch: zonale Unterschiede und Einfluss des Rührens. *Ernährung* (im Druck).
58. *Vidal-Valverde, C. and Reche, A.*: An improved high performance liquid chromatographic method for thiamin analysis in foods. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch.* 191, 313–318 (1990).

E. Tagliaferri  
 Centre de recherche Nestlé  
 Division qualité et sécurité alimentaire  
 Vers-chez-les-Blanc  
 CH-1000 Lausanne 26

Dr. J.O. Bosset  
 Dr. P. Eberhard  
 U. Bütikofer  
 Dr. R. Sieber  
 Forschungsanstalt für Milchwirtschaft  
 CH-3097 Liebefeld-Bern