

Studiengang Life Technologies

Vertiefungsrichtung Lebensmitteltechnologie

Diplom 2007

Jonas Glanzmann

*Bestimmung des Kristallisationsgrades
von Laktose in Milchpulver*

Dozent	Laurence Nicolay
Experte	Adrian Caramaschi

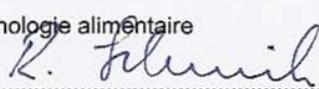
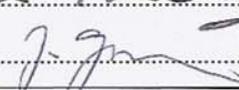
SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Technologies du vivant

Confidentiel / Vertraulich

Etudiant / Student Jonas Glanzmann	Année scolaire / Schuljahr 2006/07	No TD / Nr. DA TV/2007/49
Proposé par / vorgeschlagen von HOCHDORF Swiss Milk AG		Lieu d'exécution / Ausführungsort HES—SO Valais, DSI Expert / Experte Adrian Caramaschi

Titre / Titel: <p style="text-align: center;">Validation de la méthode de Karl Fischer pour la détermination de la quantité d'eau cristalline dans la poudre de lait</p>
Description / Beschreibung: <p>La cristallisation du lactose dans la poudre de lait a une incidence non négligeable sur la qualité de certains produits alimentaires, et plus particulièrement sur la qualité rhéologique du chocolat au lait et du chocolat blanc, à l'état fondu, ainsi que sur l'hygroscopicité de toutes les poudres de lait maigre et entier. Ce phénomène est influencé par divers paramètres dont la composition du lait (spécialement sa teneur en matière grasse), le procédé de séchage et les conditions de stockage.</p> <p>Ce travail a pour objectif principal d'adapter — et de valider — la méthode de Karl Fischer pour la détermination de la quantité d'eau cristalline présente dans la poudre de lait.</p>
Objectifs / Ziele: <ul style="list-style-type: none">— Compléter la synthèse bibliographique préparée lors du travail de semestre.— Améliorer et valider la méthode de Karl Fisher pour le dosage du lactose mono-hydraté dans des échantillons de poudre de lait maigre.— Si le temps le permet, validation de cette méthode avec des poudres de lait entier et maigre.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Resp. de l'orientation technologie alimentaire  Professeur/Dozent: Laurence Nicolay  Etudiant/Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.09.2007 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 23.11.2007 — 12h00 Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 30.11.2007 Défenses orales / Mündliche Verfechtungen Semaine 49
---	--

Bestimmung des Kristallisationsgrades von Laktose in Milchpulver

Détermination du taux de cristallisation du lactose dans la poudre de lait

Der Zustand der Laktose hat einen wesentlichen Einfluss auf die technologischen Eigenschaften von Milchpulver. Ziel dieser Arbeit ist die Ausarbeitung, Verbesserung und Validierung einer Praxis-Methode zur Bestimmung des Anteils kristalliner Laktose in Milchpulver. Verschiedene Methoden, darunter auch eine Weiterentwicklung des Autors, sollen getestet und miteinander verglichen werden. Zudem soll ein Überblick über die bestehende Literatur zum Thema geschaffen werden.

Resultate

Die Methode zur Bestimmung des Kristallisationsgrades konnte optimiert werden. Ein Modell wurde mittels linearer Regression angepasst und erlaubt so die Unterscheidung von Magermilchpulver mit kristalliner Laktose von solchem mit amorpher Laktose. Der Vertrauensbereich liegt im geforderten Bereich von 5%-12%. Die neue Methode mit isohumidem Probematerial weist einen Vertrauensbereich von 8%-18% auf. Diese Methode eignet sich für Betriebe, die über keinen Trockenschrank verfügen. Sie weist noch Verbesserungspotential auf. Beide Methoden eignen sich nur für die Bestimmung von α -Laktose-Monohydrat, sie erfassen andere Kristallformen nicht.

Schlüsselwörter

Laktose, Kristallisationsgrad, Milchpulver, Karl-Fischer-Titration, Trockenschrank, Wasseraktivität

L'état physique du lactose a une incidence non négligeable sur les propriétés technologiques des poudres de lait. L'objectif de ce travail consiste à adapter, améliorer et valider une méthode pour déterminer le taux de cristallisation du lactose dans la poudre de lait. Plusieurs méthodes dont une modification de l'auteur sont comparées les une aux autres. Un aperçu sur la littérature existante aide à discuter et comprendre le thème.

Résultats

La méthode pour déterminer l'eau de cristallisation est optimisée. La validation montre qu'elle est applicable aux poudres de lait. Le modèle proposé s'applique que pour des poudres de lait maigre. Il faut encore tester le modèle avec beaucoup plus d'échantillons de différentes compositions et avec un taux de cristallisation connu. La nouvelle méthode avec des échantillons isohumides peut s'appliquer pour des poudres de lait maigre dans des laboratoires sans étuve.

Mots-clés

Lactose, taux de cristallisation, poudre de lait, titration Karl-Fischer, séchage, activité de l'eau

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	1
1	Einführung	5
1.1.	Allgemeine Einführung und Zielsetzung	5
1.2.	Laktose, Milchpulver und Wasser	5
1.3.	Charakterisierung des Phasenzustands der Laktose	10
1.4.	KF-Titration	14
2	Material und Methoden	17
2.1.	Material und Produkte	17
2.1.1.	Arbeitssicherheit	17
2.1.2.	Karl-Fischer-Titration	18
2.1.3.	Isothermische Bestimmung der Löslichkeit	19
2.1.4.	Bestimmung des Massenverlustes im Trockenschrank	19
2.1.5.	Thermogravimetrische Analyse (TGA)	19
2.1.6.	Differential Scanning Calorimetrie (DSC)	19
2.1.7.	Near Infrared Absorbptions-Spektroskopie (NIR)	20
2.1.8.	Mikroskopie	20
2.1.9.	Herstellung von Proben mit kristalliner Laktose	20
2.1.10.	Kristallisation der Laktose in Milchpulver (Post-Kristallisation)	20
2.1.11.	Herstellung von isohumidem Probematerial	20
2.1.12.	Bestimmung des Raumklimas	20
2.2.	Methoden	21
2.2.1.	Optimierung, Validierung und Statistik	21
2.2.2.	Allgemeiner Optimierungsprozess	21
2.2.2.1.	Validierung der Analysemethode	21
2.2.2.2.	Begriffe und Definitionen	22
2.2.2.3.	Statistische Auswertung	22
2.2.3.	Optimieren der Karl-Fischer-Titration	24
2.2.3.1.	Isothermische Bestimmung der Löslichkeit	24
2.2.3.2.	Drift-Optimierung	25
2.2.3.3.	Faktorbestimmung	25
2.2.3.4.	Verbesserung der Einwaage	25
2.2.4.	<i>Optimierung der Trockenschrank-Methode</i>	25
2.2.4.1.	Zusatz von Quarzsand	25
2.2.4.2.	Reihenfolge des Wägens	26
2.2.4.3.	Temperaturschwankungen des Trockenschranks	26
2.2.4.4.	Einwägen der Tara	26
2.2.5.	<i>Bestimmung des Gehalts an α-Laktosemonohydrat</i>	26
2.2.5.1.	Modell nach Schuck und Dolivet	26
2.2.5.2.	Modell nach Roetman	26
2.2.5.3.	Anpassung eines neuen Modells	26
2.2.5.4.	Ausarbeitung einer neuen Analysemethode	27
2.2.5.5.	Herstellung von isohumidem Probematerial	27
2.2.5.6.	Differential Scanning Calorimetrie (DSC)	27
2.2.5.7.	Near Infrared Absorbptions-Spektroskopie (NIR)	27
2.2.6.	<i>Validierung der KF-Titration</i>	28

2.2.6.1.	Beurteilung der Richtigkeit	28
2.2.6.2.	Thermogravimetrische Analyse (TGA)	28
2.2.6.3.	Trockenschrank mit Restwasser-Bestimmung mit KF-Titration	28
2.2.6.4.	Mikroskopie.....	28
2.2.7.	<i>Herstellung von Proben mit kristalliner Laktose.....</i>	28
2.2.7.1.	Mischprobe aus Permeat- und Proteinpulver	28
2.2.7.2.	Kristallisation der Laktose in Milchpulver (Post-Kristallisation)	29
2.2.8.	<i>Bestimmung des Gehalts an α-Laktosemonohydrat</i>	29
2.2.8.1.	Karl-Fischer-Titration	29
2.2.8.2.	Bestimmung des Massenverlustes im Trockenschrank	29
2.2.9.	<i>Bestimmung des Raumklimas.....</i>	30
2.2.10.	<i>Literatur- und Patent Recherche</i>	30
3	Resultate	30
3.1.	Statistische Auswertung	30
3.2.	Optimierung der Karl-Fischer-Titration	31
3.2.1.	<i>Löslichkeit von α-Laktose-Monohydrat</i>	31
3.2.2.	<i>Drift-Optimierung.....</i>	31
3.2.3.	<i>Optimierung der Einwaage.....</i>	32
3.2.4.	<i>Faktor-Bestimmung.....</i>	32
3.3.	Optimierung der Trockenschrank-Methode	33
3.3.1.	<i>Zusatz von Quarzsand.....</i>	33
3.3.2.	<i>Reihenfolge des Wägens.....</i>	34
3.3.3.	<i>Temperaturschwankungen des Trockenschranks</i>	34
3.3.4.	<i>Einwägen der Tara.....</i>	34
3.4.	Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat	35
3.4.1.	<i>Bestimmung des stark gebundenen Wassers</i>	35
3.4.2.	<i>Modell nach Schuck und Dolivet</i>	35
3.4.3.	<i>Modell nach Roetman</i>	36
3.4.4.	<i>Anpassung eines neuen Modells</i>	37
3.4.5.	<i>Ausarbeitung einer neuen Analysemethode.....</i>	38
3.5.	Validierung der KF-Methode	40
3.5.1.	<i>Überprüfung der Richtigkeit der KF-Methode</i>	40
3.5.2.	<i>TGA</i>	43
3.5.3.	<i>Wiederhol-, Laborpräzision und Methodenfehler.....</i>	43
3.5.4.	<i>Mikroskopie.....</i>	44
3.5.5.	<i>Resultateunsicherheit</i>	44
3.6.	Literatur-Recherche	45
4	Diskussion	46
4.1.	Statistische Auswertung	46
4.2.	Optimierung der KF-Titration	46
4.2.1.	<i>Löslichkeit von α-Laktose-Monohydrat.....</i>	46
4.2.2.	<i>Drift.....</i>	46
4.2.3.	<i>Einwaage.....</i>	46
4.2.4.	<i>Faktorbestimmung</i>	46
4.3.	Optimierung der Trockenschrank-Methode	47
4.3.1.	<i>Zusatz von Quarzsand.....</i>	47
4.3.2.	<i>Reihenfolge des Wägens.....</i>	47

4.3.3.	<i>Temperaturschwankungen des Trockenschrankes</i>	47
4.3.4.	<i>Einwägen der Tara</i>	47
4.4.	Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat.....	48
4.4.1.	<i>Bestimmung des stark gebundenen Wassers</i>	48
4.4.2.	<i>Modell nach Schuck und Dolivet</i>	48
4.4.3.	<i>Modell nach Roetman</i>	49
4.4.4.	<i>Anpassung eines neuen Modells</i>	49
4.4.5.	<i>Ausarbeitung einer neuen Analyseverfahren</i>	50
4.5.	Validierung der KF-Methode	51
4.5.1.	<i>Überprüfung der Richtigkeit</i>	51
4.5.2.	<i>TGA</i>	52
4.5.3.	<i>Wiederhol-, Labor-Präzision und Methodenfehler</i>	52
4.5.4.	<i>Kalibrationsgerade</i>	52
5	Schlussfolgerung und Ausblick	53
6	Literatur	54
6.1.	Werke und Zeitschriften	54
6.2.	Internet-Quellen.....	59

Anhänge

60

1 Einführung

1.1. Allgemeine Einführung und Zielsetzung

Milchpulver kommen dank ihren zahlreichen funktionellen Eigenschaften in den verschiedensten Lebensmittel-Systemen zum Einsatz. Die Hersteller von Milchpulver sind ständig bestrebt, Produkte mit neuen oder verbesserten funktionellen Eigenschaften herzustellen und zu einem konkurrenzfähigen Preis auf dem Markt anbieten zu können. Der Phasenzustand der Laktose hat dabei einen wesentlichen Einfluss auf die technologischen Eigenschaften von Milchpulver [Roos, 2002], [Morgan et al, 2005], [Schuck, 2002], [Schuck et al., 2004]. Um gezielt in den Produktionsprozess eingreifen zu können, sind Kenntnisse über diese Eigenschaften und ihre Beeinflussungsmöglichkeiten notwendig. Um zu solchem Wissen zu gelangen, sind geeignete Analysemethoden unerlässlich. Diese Diplomarbeit setzt sich mit der Charakterisierung des Phasenzustands der Laktose in Milchpulver auseinander.

Ziel dieser Arbeit ist die Ausarbeitung, Verbesserung und Validierung einer Praxis-Methode zur Bestimmung des Anteils kristalliner Laktose in Milchpulver. Verschiedene Methoden, darunter auch eine Weiterentwicklung des Verfassers, sollen praktisch angewendet und miteinander verglichen werden. Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Methode zur Berechnung des Anteils an Kristallwasser mittels Berechnung aus der Differenz zwischen dem Massenverlust im Trockenschrank und der Bestimmung des Gesamtwassers [Roetman, 1982a], [Schuck, Dolivet, 2002]. Für die Bestimmung des Gesamtwassers soll die Karl-Fischer-Titration optimiert werden. Die davon abgeleitete neue Methode soll Verbesserungen im Ablauf sowie in der Reproduzierbarkeit bringen. Ein Überblick über die bestehende Literatur zur Bestimmung des Kristallisationsgrads von Laktose in Milchpulver rundet diese Arbeit ab und erläutert die notwendigen Sachkenntnisse zum Verständnis dieser komplexen Problematik.

Der erste Abschnitt der Einführung befasst sich mit dem Analyten und der Matrix, dem Milchpulver. Dabei werden auch die Eigenschaften und Anwendungen von Milchpulver in Zusammenhang mit dem Phasenzustand der Laktose betrachtet. Von besonderem Interesse sind dabei die Interaktionen der Laktose sowie der anderen Inhaltsstoffe mit Wasser. Ein Überblick über die Analysetechniken zur Bestimmung des Kristallisationsgrads der Laktose schlägt die Brücke zum Hauptthema. Es wird dann detailliert auf jene Methoden eingegangen, welche für die praktische Anwendung in einem Industriebetrieb interessant erscheinen und die Grundlage dieser Arbeit bilden.

1.2. Laktose, Milchpulver und Wasser

Die Laktose (Milchzucker) ist ein Disaccharid aus je einem Molekül Galaktose und Glucose, welche glycosidisch verbunden sind (Abbildung 1). Die Glucose behält in der Verbindung ihre reduzierenden Eigenschaften dank der freien anomeren Gruppe am C-Atom 1 (C1), welche in der offenen Form eine freie Aldehydfunktion darstellt. In der zyklischen Form sind gewisse chemische Reaktionen eingeschränkt. Interaktionen mit anderen Molekülen entstehen vor allem über Wasserstoff-Brücken (H-Brücken). Die Trocknungsart des Milchpulvers hat möglicherweise einen Einfluss auf die Anzahl freier H-Brücken und somit auch auf die Interaktionsmöglichkeiten der Laktose [Haque, Roos, 2004]. α -Laktosemonohydrat weist eine monoklinische Struktur mit je einem Molekül Laktose und Wasser pro assymetrischer Einheit auf. Zwei assymetrische Einheiten bilden

eine Zelle. Zwei nebeneinanderliegende Laktosemoleküle bilden je eine H-Brücke zwischen den Sauerstoffmolekülen an C2, C3 und C6 der Glucose sowie zwischen C2 und C6 der Galaktose. Die Wassermoleküle in der α -Laktosemonohydrat-Struktur sind in der Kopfreion angesiedelt und bilden H-Brücken mit den Sauerstoffmolekülen an C1 und C2 der Glucose sowie C3 der Galactose des anschliessenden Laktosepaares. Die Paare werden zusätzlich durch H-Brücken zwischen den Sauerstoffmolekülen an C2 der Glucose sowie an C4 der Galactose stabilisiert [Visser, Bennema, 1983].

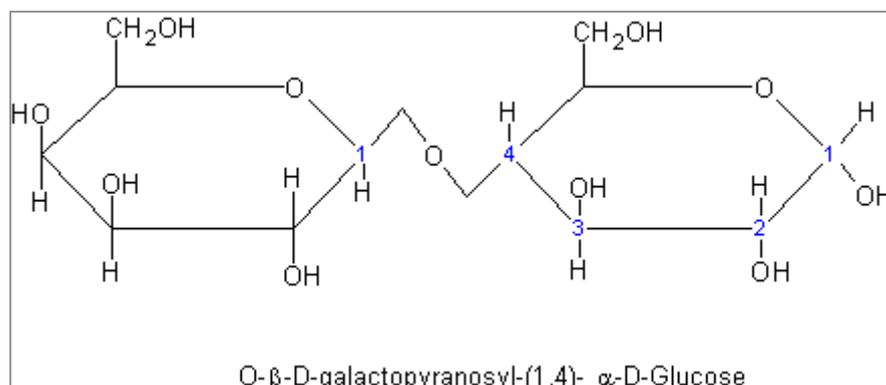


Abbildung 1: Haworth-Darstellung der α -Laktose

Die Laktose unterliegt der Mutarotation und kommt in zwei Konfigurationen, als α - und als β -Laktose vor. In wässrigen Lösungen befindet sich jeweils auch ein minimaler Anteil der Laktosemoleküle in der offenen Aldehydform [Töpel, 2004]. Der Massenanteil der Laktose in Milchpulver beträgt rund 40% in Vollmilch- und mehr als 50% in Magermilchpulver. Der Zucker liegt dabei meistens in amorphem Zustand, als Glaslaktose, vor. Dieses Laktoseglas bildet zusammen mit den Proteinen und den Mineralsalzen die kontinuierliche, wässrige Phase der Trockenmilch. Das Milchfett ist in Form von Kügelchen in dieser kontinuierlichen Phase dispergiert, wo sich auch Luftblasen befinden [King, 1965], [Roos, 2002].

Die Diastereomere der Laktose unterscheiden sich in ihrem Löslichkeitsverhalten und in ihrem optischen Drehvermögen. Bei 20°C beträgt die Gleichgewichtsrate zwischen den beiden Formen $R = 1.64$, was 62.17% β -Laktose und 37.83% α -Laktose entspricht [Walstra, Jenness, 1984]. Die Gleichgewichtskonstante für wässrige Laktose-Lösungen berechnet sich gemäss Gleichung 1. Die Einstellung des chemischen Gleichgewichts ist abhängig vom verfügbaren Wasser und von der Temperatur. Sie erfolgt in verdünnten Lösungen rasch, kann im Laktoseglas jedoch mehrere Stunden bis hin zu mehreren Wochen dauern. Die Gleichgewichtskonstante für Laktose im Glaszustand beträgt 1.25 und ist unabhängig von der Temperatur [Roetman, 1982b].

Gleichung 1: Berechnung der Gleichgewichtskonstante R für verdünnte Laktose-Lösungen als Funktion der Temperatur (ϑ , in Grad Celsius) [Walstra, Jenness, 1984].

$$R = \frac{[\beta - \text{Laktose}]}{[\alpha - \text{Laktose}]} = 1.64 - 0.0027 * \vartheta$$

Laktose ist generell weniger gut löslich als andere Zuckerarten. Bei 25°C lösen sich zum Beispiel nur 22g Laktose im Vergleich zu 220g Saccharose. Die Löslichkeit nimmt mit steigender Temperatur zu. Im Temperaturbereich von 5°C bis 35°C werden sehr schnell Übersättigungsbedingungen erreicht, was für die Kristallisation ein entscheidender Faktor ist [Töpel, 2004]. Eine Lösung ist übersättigt, wenn sich darin mehr Moleküle befinden, als

das thermodynamische Gleichgewicht erlaubt. Eine Übersättigung kann durch Abkühlen oder durch Aufkonzentrieren einer Lösung erreicht werden [Hartel, Shastry, 1991].

Die β -Form ist bei tieferen Temperaturen besser löslich als die α -Form, und bis hin zu einer Temperatur von 93.5°C kristallisiert in übersättigten Lösungen Laktose in Form von α -Laktose-Monohydrat aus. Bei Temperaturen oberhalb 93.5°C ist hingegen die Löslichkeit der β -Form limitierend. Bei einer Übersättigung oberhalb dieser Temperatur kristallisiert deshalb die anhydrierte β -Laktose aus [Hartel, Shastry, 1991]. Unter speziellen Druck- und Feuchtigkeits-Bedingungen kann bei Temperaturen von 100°C und 150°C oder in einer Übersättigung von Laktose in Ethanol auch eine anhydrierte α -Form auskristallisieren [Walstra, Jenness, 1984]. Letzteres entspricht einer Trocknung von α -Laktose-Monohydrat mit Ethanol, welche Hartel und Shastry beschrieben haben.

Kristallisationen erfolgen in zwei Stufen. Zuerst erfolgt die Nukleation, die Keimbildung, in der zweiten Phase wachsen dann diese Keime zu grösseren Kristallen an. In der thermodynamisch stabilen Zone findet keine Kristallisation statt. Bestehende Kristalle werden abgebaut und gehen in Lösung über. Die spontane Kristallisation findet erst in der labilen Zone der Übersättigung statt. Zwischen der labilen und der stabilen Zone liegt die metastabile Zone. Bei diesen Bedingungen können vorhandene Kristallisationskeime zwar wachsen, eine spontane Keimbildung ist jedoch nicht zu erwarten. Die Nukleation wird durch tiefere Temperaturen begünstigt, das Kristallwachstum hingegen durch höhere Temperaturen. Die optimale Temperatur für eine maximale Kristallisationsrate liegt deshalb im mittleren Temperaturbereich [Roos, Jouppila, Söderholm, 1999]. Ein Zusatz von Saccharose in eine Laktoselösung vermindert die Löslichkeit der Laktose und begünstigt somit die Kristallisation. Denselben Effekt scheinen auch andere zugegebene Zucker oder Hydrolyse-Produkte der Laktose auszuüben [Hartel, Shastry, 1991]. Als Inhibitoren des Wachstums von α -Laktose-Monohydrat-Kristallen sind die Milchinhaltstoffe Riboflavin, Laktosemonophosphat und β -Laktose bekannt. Weitere Einflussfaktoren des Kristallwachstums sind die Temperatur und die Viskosität der Lösung. Diese beeinflussen die Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle [Töpel, 2004]. Der Massentransfer kann auch durch andere Makromoleküle, Zuckermoleküle und Salze beeinträchtigt werden. Dadurch wird das Kristallwachstum ebenfalls gebremst [Hartel, Shastry, 1991]. Proteine verzögern den Kristallisationsbeginn und Fettmoleküle verlangsamen die Kristallisation von Laktose in Milchpulver [Thomas et al., 2004].

Um die Stabilität von Milchpulver mit vorwiegend amorpher Laktose beurteilen zu können, muss die Glasübergangstemperatur betrachtet werden. Liegt die Umgebungstemperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur, so wird eine Kristallisation der Laktose ermöglicht. Dieser Effekt ist zeit- und temperaturabhängig. Je grösser die Differenz zwischen der Umgebungstemperatur und der Glasübergangstemperatur ist, desto schneller erfolgt die Kristallisation. Bei der so genannten kritischen Umgebungstemperatur erfolgt die unerwünschte Veränderung spontan. Bei einer Temperatur nahe der Übergangsgrenze kann das Produkt noch während Wochen stabil sein, bevor die Veränderungen bemerkbar werden. Die Glasübergangstemperatur ist abhängig vom Wassergehalt. Je höher der Wassergehalt, desto tiefer die Glasübergangstemperatur. Eine heterogene Verteilung von Wasser im Produkt kann deshalb zu lokalen Kristallisationsherden führen [Roos, 2002].

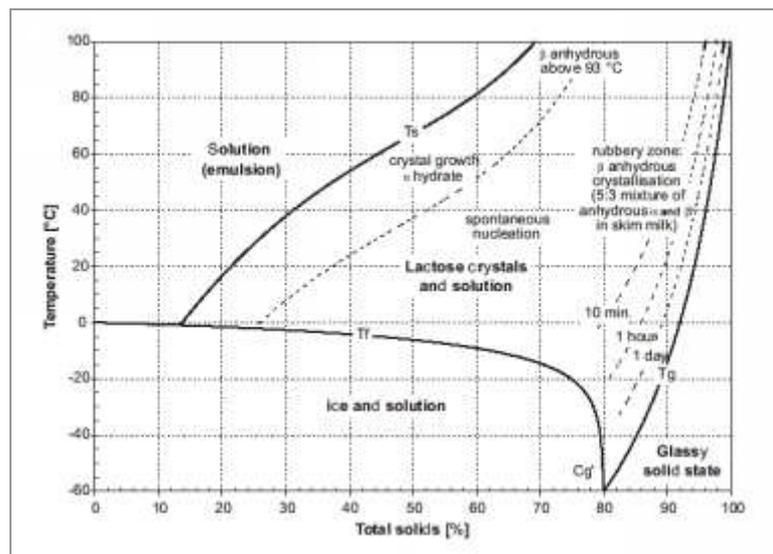


Abbildung 2: Phasendiagramm von Vollmilch (Phasenzustand von Laktose und Wasser) nach [Vuataz, 2002]

Ein Phasendiagramm (Abbildung 2) kann dazu genutzt werden, um einer Kristallisation vorzubeugen, wenn diese nicht erwünscht ist, zum Beispiel bei der Lagerung von Milchpulver. Eine unkontrollierte Kristallisation der Laktose in Milchpulver kann zu einem Verlust der Fließfähigkeit, zum Verkleben und durch die damit einhergehende Wasserabgabe zu verstärkter chemischer Reaktivität mit einem Verlust an Lysin führen [Roos, 2002]. Korte, Hansen und Fligner beschreiben die Risiken einer Kristallisation der Laktose während der Lagerung. Die Hygroskopizität der amorphen Laktose sei ein Faktor der Wasseraufnahme. Sie schlagen eine Prekristallisation des Konzentrates bei Temperaturen von 0°C bis 20°C vor [Korte, Hansen, Fligner, 1994]. Andererseits können die Daten aus dem Diagramm auch dazu genutzt werden, um gezielt die Kristallisation der Laktose in Milchpulver zu fördern, wenn dies im Endprodukt erwünscht ist. Die Kristallisation der Laktose in Milchtrockenprodukten wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht.

Bohren, Kuypers und Meister beschreiben zwei Gruppen Milchpulver: Bei der ersten handelt es sich um herkömmliche Sprühmilchpulver mit „minimal processing“, welche zur Verbesserung der Auflösungseigenschaften agglomeriert werden können. Sie enthalten üblicherweise amorphe Laktose. Die zweite Gruppe Milchpulver eignet sich besonders für den Einsatz in Saucen, Desserts, Biscuit, Konfekt und Schokolade und zeichnet sich durch eine kompakte Struktur, hohen Gehalt an leicht extrahierbarem Fett sowie Aromakomponenten der Maillard Reaktion aus. Diese Pulver werden aus vorkristallisiertem Magermilchkonzentrat mittels Sprühtrocknung hergestellt. Walzenpulver hat ähnliche Eigenschaften, nur dass darin die Laktose immer amorph vorliegt [Bohren, Kuypers, Meister, 1987]. Verhey und Bondt sind der Meinung, dass Milchpulver für die Schokoladeindustrie besser geeignet sei, wenn es feiner und weniger porös ist. Sie stellen ein Verfahren zur Herstellung eines Pulvers mit einer gewichtsmittleren Partikelgrösse von 40µm bis 70µm vor. Die Porosität soll weniger als 3ml/100g Pulver betragen [Verhey, Bondt, 1987]. Die von Miller beschriebene Methode, „wasserfreies“ Magermilchpulver mit wasserfreiem Milchfett zu beschichten, erzeugt ein Vollmilchpulver mit vollumfänglich „freiem“ Fett [Miller, 1997]. Baechler et al. verbesserten die Fließ- und die Auflösungseigenschaften von Milchpulver mittels Postkristallisation. Zuerst wurde der a_w -Wert der Pulver auf 0.15 bis 0.7 eingestellt. Die partielle Kristallisation wurde durch ein Erwärmen der Pulver auf 25°C bis 55°C oberhalb der Glasübergangstemperatur für 10

Minuten bis zu zwei Stunden erreicht. Der Anteil kristalliner Laktose betrug zwischen 5% und 50% [Baechler et al., 2006].

Die Zusammensetzung von drei häufig verwendeten Milchtrockenprodukten ist in Tabelle 1 dargestellt. In Voll- und Magermilchpulver ist Laktose der mengenmässig wichtigste Bestandteil. Magermilchpulver darf höchstens 15 Gramm Fett pro Kilogramm enthalten. Der Proteingehalt liegt zwischen 21 und 35, der Aschegehalt zwischen 5 und 8 Massenprozent.

Tabelle 1: Zusammensetzung verschiedener Milchdauerwaren [SLMB, 2004].

Beschreibung	Laktose [g/100g]	Fett [g/100g]	Proteine [g/100g]	Asche [g/100g]	Wasser [g/100g]
Vollmilchpulver	39	25	25	7	3.5
Magermilchpulver	52	0.8	35	8	4.5
Hochfettpulver	28	42	21	5	4

Der Wassergehalt, das Sorptionsverhalten sowie die Verteilung und der Transfer von Wasser im Produkt sind äusserst wichtige Eigenschaften bezüglich der Qualität und der Stabilität der Milchtrockenprodukte [Schuck, 2002]. Milchpulver ist die grösste Wasserquelle bei der Schokoladeherstellung [Verhey, 1986]. Ein Eintrag von 0.3% freiem Wasser erhöht den Fettbedarf um 1% [Beckett, 2000]. Falls amorphe Laktose während dem Conchieren auskristallisiert, wird Wasser abgegeben. Dies kann auch zur Bildung von Zucker-Protein-Komplexen führen. Diese „Clusters“ rufen die Griessigkeit in der Schokoladenmasse hervor [Nováková et al., 2002]. Eine Arbeit befasste sich mit der Herstellung von Spezial-Milchpulver für die Schokoladeindustrie mit hohem Anteil an freiem Fett [Keogh, Murray, O’Kennedy, 2003a]. In einer anderen Arbeit wurde der Einfluss von Milchpulver auf Schokolade untersucht [Keogh, Murray, O’Kennedy, 2003b]. Auch Liang und Hartel untersuchen den Einfluss von Eigenschaften von Milchpulver auf Schokolade. Sie kommen zum Schluss, dass es keine reinen Korrelationen gibt, sondern dass es sich oft um Mehrfach-Effekte handelt [Liang, Hartel, 2004]. Während der Lagerung und dem Transport können sich die Eigenschaften von Milchtrockenprodukten negativ verändern. Auslöser dafür sind die Kristallisation der Laktose, Maillard- Reaktion oder Fett-Oxidation, verursacht durch die Lagerbedingungen und die Zusammensetzung des Pulvers sowie der Verpackung. Die Auswirkungen sind ein Verkleben der Pulver, eine Braunfärbung, Fehlgerüche (z.B. Ranzigkeit), pH-Absenkung sowie verminderte Löslichkeit und Hitzestabilität [Augustin, Clarke, Craven, 2003].

Wasser fungiert in Milchpulver als „Plasticicer“ und als Lösungsmittel von Proteinen, Laktose und Salzen und bestimmt dadurch deren Mobilität und Reaktionsfähigkeit. Die Wasseraktivität wird durch die fettfreie Trockenmasse bestimmt und kann durch Strukturänderungen und Kristallisationen beeinflusst werden [Roos, 1997]. Gemäss Pisecky haben Fett und α -Laktosemonohydrat keinen Einfluss auf die Wasseraktivität von Milchpulver, amorphe Laktose hingegen schon [Pisecky, 1992]. Pulver mit einem hohen Anteil an Kaseinen oder denaturierten Molkenproteinen weisen eine deutlich höhere Wasserbindungskapazität auf als Standard-Milchpulver oder solche mit nativem Molkeneiweiss [Augustin, Clarke, Craven, 2003]. Bei tiefen Wassergehalten werden die Bindungskräfte der verbleibenden Wassermoleküle mit der Festphase sehr stark [Rückold et al., 2003]. Tabelle 2 fasst Literaturangaben über die Energie von unterschiedlichen Bindungstypen zusammen. Wasser kann auch in eine feste Phase, wie z.B. eine Kristallstruktur, eingeschlossen sein.

Die Interaktionen von Wasser mit Milchpulver-Bestandteilen sind abhängig von der Zugänglichkeit von Zonen mit hydrophilen Eigenschaften. Dazu gehören Ionen, ionisierbare Gruppen und polare Gruppen (H-Brücken-Bildung). Beeinflusst werden die

Interaktionen von der Konformation (z.B. Proteinfaltung), dem pH-Wert und der Ionenstärke [Hardy, Scher, Banon, 2002]. Zuckermoleküle können mit den polaren Gruppen von Proteinen H-Brücken ausbilden und somit auch Wasser ersetzen, welches beim Trocknungsprozess entfernt wird. Dadurch stabilisiert der Zucker die Proteine, diese wiederum verzögern die Kristallisation des Zuckers [Nasirpour, Scher, Desobry, 2006]. Sherwin und Labuza unterscheiden nur Gebundenes Wasser (H-Brücken) und Löslichkeitswasser. Letzteres stehe nicht in direktem Kontakt mit der festen Phase. Die Monolayer-Theorie entspräche nicht der Realität, da das Wasser sich in Verbänden (Cluster) an polare Stellen anlagern würde. Das BET-Modell, welches auf der Monolayer-Theorie beruhe, könne jedoch Voraussagen zur Adsorption und Stabilität von Lebensmitteln ermöglichen [Sherwin, Labuza, 2006].

Tabelle 2: Literaturangaben über die Energie von unterschiedlichen Bindungstypen

Bindungsart	[Hardy, Scher, Banon, 2002]	[Figura, 2004]
Kovalente Bindung	460 kJmol ⁻¹	-
Konstitutionswasser	-	250 kJmol ⁻¹
Dipol-Ion-Bindung	-	15 kJmol ⁻¹
H-Brücke (Wasser-Wasser)	20 kJmol ⁻¹	20 kJmol ⁻¹
Monolayer	5 kJmol ⁻¹	20 kJmol ⁻¹
2. H ₂ O-Schicht (2nd layer)	2 kJmol ⁻¹	2 kJmol ⁻¹
„Freies“ Wasser	-	2 kJmol ⁻¹
Van der Waals Kräfte	0.5 kJmol ⁻¹	-

1.3. Charakterisierung des Phasenzustands der Laktose

Roetman hat sich intensiv mit der Kristallisation der Laktose und deren Nachweis in Milchprodukten befasst und wird sehr oft zitiert [Roetman, 1982a]. Er teilt die Analysemethoden nach vier Typen auf.

Typ 1: Die Separationsmethode versucht, die Laktose-Kristalle quantitativ aus dem Produkt herauszutrennen und die Menge dann mittels Bestimmung der verbleibenden Laktose zu berechnen. Diese Methode ist nur auf Lösungen anwendbar. Eine Separationsmethode hat auch Zähler für die Untersuchung von Choc-Ovo-Dicksaft angewendet, allerdings für die Charakterisierung der Kristalle und nicht für die quantitative Bestimmung [Zähler, 2005].

Typ 2: Messung von physikalischer Eigenschaft, welche durch kristalline Laktose anders beeinflusst wird als durch gelöste Laktose. Eine solche Eigenschaft ist der Brechungsindex. Dieser kann jedoch nur von Lösungen gemessen werden und nicht von pulverförmigen Proben.

Typ 3: Berechnung auf Grund der Bestimmung des Isomeren-Verhältnisses im Produkt mit kristalliner Laktose. Voraussetzung ist, dass die β/α -Rate in der amorphen Laktose bekannt ist und die kristalline Phase nur aus α -Laktose besteht. Somit lässt sich aus der β/α -Rate der Analyseprobe der Anteil an kristalliner α -Laktose berechnen. Zur Bestimmung des Isomeren-Verhältnisses eignen sich mehrere apparative Methoden: Polarimetrie [Roetman, 1982], GC (nach Derivatisierung mit Trimethylsilyl) [Dincer et al., 1999], NIR, NMR.

Typ 4: Direkte Bestimmung des Kristallwassers von α -Laktosemonohydrat. Da jedes Molekül dieser Kristallform ein Molekül Wasser bindet, kann aufgrund des Kristallwassergehalts die Menge kristalliner Laktose berechnet werden. Die gebundene

Menge Wasser entspricht fünf Prozent des Kristallgewichts. Roetman schlägt die Karl-Fischer-Titration (KF-Titration) für die Bestimmung des Gesamtwassers sowie eine moderate Trocknungsmethode für die Bestimmung des „freien“ Wassers vor. Das Kristallwasser berechnet sich aus der Differenz der beiden Analyse-Ergebnisse und benötigt Korrekturfaktoren, da auch Proteine und Salze Wasser fest binden. Es ist auch die Kombination der KF-Titration mit der Toluol-Destillation möglich, um das Kristallwasser zu bestimmen.

Eine Review aus der pharmazeutischen Forschung fasst den aktuellen Stand der Phasenzustand-Analytik zusammen [Shah, Kakumanu, Bansal, 2006]. Methoden, welche sich für Laktose-Pulver eignen, sind in der Milchindustrie nicht unbedingt mit gleichem Erfolg anwendbar. Die neuen Methoden gehören meistens entweder zu den spektroskopischen oder zu den thermischen Methoden. Hurrell hat in seiner Diplomarbeit die aktuellen Analysemethoden beschrieben [Hurrell, 2005]. Eine sehr gute Übersicht über Methoden findet man auch bei [Listiohadi, 2005a].

Zu den thermischen Methoden gehören die Differenz Scanning Kalorimetrie (DSC) und die thermogravimetrische Analyse (TGA). DSC analysiert Änderungen der Wärmekapazität und ermöglicht so die Bestimmung der Glasübergangstemperatur. Normalerweise wird mit Erwärmungsraten von 5°C pro Minute gearbeitet [Rahman, 2006]. Die TGA zeichnet den Massenverlust auf, der bei der stufenweisen Erwärmung der Probe entsteht. Auch hier wird oft mit Raten von 5°C pro Minute gearbeitet. Berlin, Kliman und Pallansch untersuchten Milch- und Molkepulver sowie Proteinfractionen mit DSC und TGA. Sie stellten eine gute Korrelation zwischen TGA und theoretischer Berechnung von Kristallwasser fest [Berlin, Kliman, Pallansch, 1970a+b]. Listiohadi et al. untersuchten Milchpulver, Molkepulver und Laktose mittels TGA [Listiohadi et al., 2005b], [Listiohadi et al., 2005c], Figura hat verschiedene Heizraten bei der TGA von Laktose ausgetestet [Figura L.O., 1993].

Berlin, Anderson und Pallansch haben auch das Dampf-Sorptions-Verhalten von Milchpulver mittels einer gravimetrischen Methode untersucht. Damit bereiteten sie bereits die „neueste“ Analysemethode, die Dynamische Dampf-Sorption-Analyse (DVS) vor [Berlin, Anderson, Pallansch, 1968a+b]. In letzter Zeit wurde die DVS weiter entwickelt und für die Bestimmung des Anteils amorpher Laktose in Laktose, Schokolade und Milchpulver angewendet [Lane, Buckton, 2000], [Ziegleder, 2003].

Drapier-Beche, Fanni und Parmentier untersuchten Laktose mittels Polarimetrie, Dünnschichtchromatographie (TLC), DSC und IR-Spektroskopie. Mit der TLC vermochten sie die unterschiedlichen Kristallformen und Mischkristalle zu separieren [Drapier-Beche, Fanni, Parmentier, 1999].

Zu den spektroskopischen Methoden zählen die Kernresonanz- (NMR), Nahe-Infrarot- (NIR) und die Röntgenstrahlen-Spektroskopie (XRD). Die NMR liefert Informationen über Wasserstoff-Atome. Sie vermag zwischen unterschiedlich gebundenem Wasser zu unterscheiden, benötigt jedoch eine präzise Kalibration mittels einer Referenzmethode. Auch die NIR muss mit Referenzmethoden kalibriert werden. Sie hat eine sehr gute Sensibilität für Wasser, wird heute jedoch auch für Gesamtanalysen kalibriert [Mathlouthi, 2001]. XRD liefert Informationen über die Ordnung in einer Struktur. Sie wurde auch schon quantitativ zur Bestimmung von Laktosekristallformen angewendet. Auch XRD muss kalibriert werden [Hartel, 2001]. Shawqi et al. untersuchten sprühgetrocknete Laktose/Protein-Mischungen mittels XRD und dem Elektronenmikroskop [Shawqi et al., 2006]. NIR-Analysen hat auch Merck bei seiner Arbeit mit Milchtrockenprodukten angewendet [Merck, 2006]. Vuataz hat in NIR-Spektren drei Zonen untersucht, wo sich α - und β -Laktose sowie Kristallwasser nachweisen lassen [Vuataz, 1988].

Da beim Auftraggeber die vorhandene Einrichtung der Labors genutzt werden soll, fallen die kapitalintensiven, apparativen Methoden für die Hauptmethode dieser Arbeit weg. Sie könnten allenfalls zur Überprüfung der Richtigkeit herangezogen werden. Der Fokus wird deshalb auf die Berechnungsmethoden mittels Bestimmung des Kristallwassers gelenkt.

Tabelle 3: Parameter von Trocknungsmethoden zur Bestimmung des Massenverlustes; a Trocknung bis zur Gewichtskonstanz

Quelle	Einwaage [g]	Temperatur [°C]	Trocknungszeit [h]	Bemerkungen
Niro A/S, A1a [a]	-	102±2	a	Behälter mit Deckel
Niro A/S, A1b [a]	3	102±2	3	Behälter mit Deckel
Niro A/S, A1c [a]	3	87±2	6	Behälter mit Deckel
[Hurrell, 2005]	5	103±2	3-4	-
	5	87±2	6	-
	5	70±2	6	Vakuum
[SLMB, 2004]	1-3	102±2	2, a	-
[Merck, 2006]	2	102	diverse	-
	5	87	5	-

Merck hat in seiner Arbeit das Verhalten von Milchtrockenprodukten untersucht [Merck, 2006]. Er kam zum Schluss, dass es bei der Wahl der Trocknungstemperatur auf den Gehalt an Laktose und Proteinen ankommt, was mit dem Risiko von Maillard-Reaktionen und der Bildung flüchtiger Komponenten erklärt werden kann. Durch diese Reaktion entstehen Massenverluste, welche einen zu hohen Wasserverlust vortäuschen könnten. Kristalline Laktose wiederum gibt das Kristallwasser erst bei Temperaturen von 140°C vollständig ab. Die Bestimmung des Gesamtwassers ist deshalb gemäss Merck mit den Trockenschrank-Methoden nicht möglich. Er schlägt die Karl-Fischer-Titration oder die NIR-Spektrometrie zur Anwendung vor. Da in dieser Arbeit mit dem Trockenschrank nur das weniger stark gebundene Wasser bestimmt werden soll, sind die Trockenschrank-Methoden sehr gut anwendbar. Die Temperatur darf allerdings nicht zu hoch gewählt werden. Vugrinec hat bei seinen Versuchen festgestellt, dass die kristalline Laktose im Vakuumtrockenschrank bei Temperaturen ab 70°C das Kristallwasser abgibt [Vugrinec, 2004]. Bei Temperaturen darunter erreichte er Massenkonstanz und erwartungsgemäss tiefere Werte. Tabelle 3 fasst Methoden zur Bestimmung des Trocknungsverlustes im Trockenschrank zusammen. Meistens wird bei 102°C oder bei 87°C getrocknet. Heinrich kam zum Schluss, dass α -Laktose-Monohydrat bei Temperaturen von 87°C nur das adsorbierte Wasser abgibt, bei höheren Temperaturen jedoch keine Gewichtskonstanz erreicht werde, da das Kristallwasser langsam abgegeben werde [Heinrich, 1970]. Im Vakuumtrockenschrank kann mit tieferen Temperaturen gearbeitet werden. Mathlouthi meint, dass im Vakuumofen beim Trocknen von Lebensmitteln oft kein Gleichgewicht erreicht werde [Mathlouthi, 2001].

Für die Bestimmung des Gesamtwassers bieten sich viele Methoden an. Rückhold, Grobecker und Isengard folgern, dass die KF-Titration die einzige Methode ist, die mit befriedigender Präzision und guter Reproduzierbarkeit das Gesamtwasser von Milchpulver erfassen kann [Rückhold, Grobecker, Isengard, 2000]. Trocknungsmethoden erfassen weder das freie Wasser, noch erfassen sie alles gebundene Wasser, sagen die Autoren. Tabelle 4 fasst einige Methoden zur Bestimmung des Gesamtwassers in Milchpulver mittels Karl-Fischer-Titration zusammen. Die Probe wird zuerst in einem Lösungsmittel mit Methan gelöst. Dabei wird das in der Probe vorhandene Wasser frei gesetzt. Das Wasser kann nun mit einer Jodhaltigen Lösung titriert werden. Jod wird von Schwefeldioxid

reduziert, solange Wassermoleküle an der Reaktion teilnehmen können. Sobald alles Wasser reagiert hat, kommt die Reaktion zum Erliegen [Scholz, 1984]. Merck hat in seiner Arbeit einen KF-Ausheizofen benutzt. Dabei wird den trockenen Proben, welche in Vials eingewogen werden, das Wasser mit Hitze ausgetrieben. Ein trockener Luftstrom transportiert den Wasserdampf in die KF-Titrationszelle, wo das Wasser titriert wird [Merck, 2006]. Schuck und Dolivet haben eine extreme Vakuum-Trocknungsmethode mit der KF-Titration verglichen und sind zum Schluss gekommen, dass ihre Methode auch das Gesamtwasser erfasst [Schuck, Dolivet, 2002].

Tabelle 4: Methoden zur Bestimmung des Gesamtwassers in Milchtrockenprodukten mittels Karl-Fischer-Titration; Met-OH Methanol

Quelle	Lösungsmittel, Titiermittel	Einwaage	Bemerkungen
Niro A/S, A1d [a]	Met-OH	-	Einwaage von 10-50mg H ₂ O empfohlen
	Met-OH/Formamid	-	für polare Substanzen; mindestens 50% Methanol
	Met-OH/Chloroform	-	für fettthaltige Produkte; mindestens 25% Methanol
[SLMB, 2003]	KF-Lösungsmittel	0.5 g	Temperatur: 50°C; Zusatz von Triton X-100
[Hurrell, 2005]	Methanol/Formamid/Chloroform zu gleichen Teilen	-	Temperatur: 50°C
[Merck, 2006]	Hydranal Solvent / Formamid (2:1;v:v)	-	Temperatur: 40°C; 600s Extraktionszeit
[McComb, 1957]	Extraktion in Formamid (extern)	-	Titration sobald Laktose aufgelöst war
[Scholz, 1984]	Extraktion 1h mit Met-OH (extern)	-	Titration von aliquotem Teil
[Isengard, 1991]	30ml Met-OH, Composite 5	-	Ultra-Turrax (8000rpm) kein Milchpulver
[Isengard, 1992]	Met-OH, Composite 5	(20-40mg H ₂ O)	T=40°C und 22°C; Rührer (900rpm)
[DeCaro, 2001]	Met-OH mit Hochfrequenzmixer	-	Mit Homogenisierung lasse sich der Einsatz von Formamid vermeiden und die externe Extraktion umgehen.
[Rückold, 2000]	Hydranal Solvent, Titrant 5	-	-
Metrohm Manual	Met-OH/Formamid (2:1;v:v)	1g	T=50°C; (Kindernahrung)
Hydranal-Guide [CD-ROM]	Met-OH dry-Rapid, Composite 5	1 g	T=50°C (oder auch Solvent, Titrant 5)
Hydranal-Guide [CD-ROM]	Met-OH/Formamid (1:1;v:v)	0.5 g	T=50°C (Laktose-Monohydrat)
[Thomasow, 1972]	Met-OH, KF-Lösung	(4-10ml Titration)	Direkte Titration
[Zürcher, 1979]	Met-OH; Titration in der Wärme	-	Hochfrequenzzerkleinerung universell
[Reh, 2004]	Met-OH, Composite 5	-	Raumtemperatur; 0.5g Einwaage
[Isengard, 2006]	Hydranal Solvent, Titrant 2	0.1 – 0.5 (aLM + MMP)	T=50°C (sei ohne Formamid möglich)
[DeKnegt, 1998]	Extraktion 5h: 1.5g in 25ml Met-OH (gerührt)	-	10ml werden schliesslich titriert
[Rüegg, 1985]	50g in 500ml Met-OH mit Ultra-Turrax	0.2 g	2ml vom Mix werden analysiert
[Rüegg, 1987]	Zweikompon. mit 1% Triton X-100	-	Problem mit Streuung der Resultate
[Nagarajan, 2006]	30ml Met-OH, KF-Reagens	-	6 Minuten Rührzeit (Extraktion)

Tabelle 5 zeigt Details von Arbeiten, welche die KF-Titration optimieren oder validieren wollten. Oft wurden in den Versuchsplänen zwei bis maximal drei Faktoren variiert. Im Rahmen dieser Arbeit soll in einer ersten Phase die Bestimmung des Kristallwassers mittels Berechnung der Differenz zwischen dem Massenverluste im Trockenofen sowie die KF-Titration für die Anwendung bei Magermilchpulver optimiert und validiert werden. In einer zweiten Phase kann die Methode dann für Vollmilchpulver angepasst und validiert werden.

Tabelle 5: Zusammenstellung von Versuchsplänen, welche bei der Optimierung und Validierung der KF-Titration zur Anwendung kamen.

Quelle	Faktoren (Niveau)	Konklusion	Bemerkungen/Methoden
[Thomasow, 1972]	-	- Elektrode regelmässig reinigen - Keine langen Extraktionen - Genaue Standardisierung nötig - Einwaage konstant halten	- Blindwert und Faktor - Mittl. Fehler: 0.015% H ₂ O
[Rüegg, 1985]	- Solvent (3) - Titrant (3)	Alle Reagenzien ergeben die selben Resultate.	- Externe Extraktion mit Ultra Turrax - Friedmann-Rangtest
[Rüegg, 1987]	- Lsg-Mittel-Zusätze (5) - Komponenten (2)	1% Zusatz von Triton X-100 begünstigt Benetzung und Dispersion	- Driftkorrektur - Streuung: 0.6 g/kg; 1.8% H ₂ O
[Isengard, 1991]	- Homogenisation (2) - Met-OH, Compo 5 (fix)	Zeitgewinn durch Homogenisation	- Beurteilung der Titrations-Kurve
[Isengard, 1992]	- Rührstab (2); T (2) - Extraktionszeit (3) - Met-OH, Compo 5 (fix)	- Zeitgewinn durch Extraktion - 40°C sei ein guter Kompromiss - Serien-Eignung	- n=2 bis 10 (meist 4 bis 5) - externe Extraktion in den späteren Titriergefässen
[Isengard, 2006]	- Lsg-Mittel (2) - Einwaage (2) (0.5/0.1g) - T=50°C (fix)	- KF sei schnell, präzise und richtig - Nachteil: Chemikalien	- Met-OH/Formamid (2:1) - 0.14g/100g ≈ 2-5% H ₂ O

1.4. KF-Titration

Da die hier gewählte Methode den Kristallisationsgrad anhand der analysierten Menge Kristallwasser berechnet, ist es wichtig, dass das Kristallwasser vollständig erfasst wird. Das Ziel der Probenvorbereitung ist die vollständige Freisetzung des Wassers in das Lösungsmittel [DeCaro, 2001]. Die Semesterarbeit hat gezeigt, dass die Probenvorbereitung ein kritischer Punkt der KF-Titration ist. Sie kann ausserhalb oder in der Titrierzelle durchgeführt werden. Wenn möglich, ist sie direkt in der Titrierzelle durchzuführen, denn dadurch wird der Ablauf vereinfacht und die Fehleranfälligkeit reduziert. Das in den Laktosekristallen gebundene Wasser muss vor Titrationsbeginn vollständig freigesetzt werden, da ansonsten ein schleppender Endpunkt und zu tiefe Wassergehalte resultieren. Die Diffusion ist in kristallinen Strukturen erschwert. Gewisse Autoren sind der Meinung, dass die Laktose deshalb vollständig gelöst vorliegen muss [McComb, 1957]. Andere sind der Meinung, dass eine vollständige Auflösung nicht notwendig sei, da das Wasser wegen der grösseren Affinität zum Methanol und dem hohen Konzentrationsgefälle genügend schnell aus dem Kristallgitter zum Lösungsmittel diffundiert [Sherwin, Labuza, 2006]). Diese Meinung teilen auch praxiserprobte Analytiker [persönliche Mitteilung von Rey J., 2007]. Zur Verbesserung der Löslichkeit wird bei Zucker- und Proteinhaltigen Lebensmitteln der Zusatz von Formamid empfohlen. Chloroform kommt bei fetthaltigen Matrices zum Einsatz [Scholz, 1984]. Die Löslichkeit der Laktose ist ausserdem ein Faktor, welcher die zu wählende Probemenge beeinflussen kann [persönliche Mitteilung von Wüst M., 2007].

Die Löslichkeit, ein thermodynamisches Gleichgewicht, wird durch die Natur des Lösungsmittels (Polarität) sowie durch die Temperatur beeinflusst [Neumüller, 1981]. Laktose ist in Wasser gut, in Alkoholen weniger gut und in Diethylether ($\text{H}_5\text{C}_2\text{-O-C}_2\text{H}_5$) nicht löslich [Eisenbrand, 1995]. Da die KF-Titration den Wassergehalt einer Probe bestimmen soll, kommt Wasser als Lösungsmittel nicht in Frage. Da Alkohole weniger gute Lösungsmittel für Laktose sind, muss auch der Faktor Temperatur in die Betrachtung einbezogen werden. Scholz empfiehlt zur Erwärmung ein Ölbad oder eine Heizplatte. Die Temperatur hat im Bereich bis 50°C keinen Einfluss auf die Stöchiometrie der KF-Titration. Die Extraktionszeit verkürzt sich bei Saccharose von einer Stunde bei 20°C auf drei Minuten bei 50°C [Scholz, 1984]. Bei sehr hohen Temperaturen laufen möglicherweise Nebenreaktionen mit Formamid ab. Auf jeden Fall sollte der Blindverbrauch der geheizten Zelle ermittelt werden. Isengard empfiehlt die Temperatur von 40°C , um die Vorteile der schnelleren Extraktion zu nutzen ohne jedoch Wasserverluste zu riskieren. Die Extraktion bei 22°C dauert in etwa doppelt so lange wie bei 40°C [Isengard, 1992].

Brito und Giulietti zitieren Nývlt et al., welche zwei Methoden zur experimentellen Bestimmung der Löslichkeit beschreiben. Bei der polythermischen Methode wird die Sättigungstemperatur durch stufenweises Erwärmen und Abkühlen einer Lösung mit bekanntem Gehalt an Laktose ermittelt. Bei der isothermischen Methode wird die Löslichkeitsgrenze durch schrittweise Zugabe von Lösungsmittel zu einer bekannten Menge Laktose ermittelt. Die Temperatur der Lösung bleibt dabei konstant [Brito, Giulietti, 2007].

Die Löslichkeit von α -Lactosemonohydrat in DMSO beträgt 40 Gramm pro 100 Gramm DMSO bei einer Temperatur von 30°C . Diese ist somit mehr als vier Mal höher als die Löslichkeit in Wasser [Dincer et al., 1999].

Lowe und Paterson untersuchten Modelle, welche die Auflösung von α -Lactosemonohydrat beschreiben. Der Auflösungsprozess wird durch zwei Gleichgewichte charakterisiert: Das erste zwischen dem kristallinen α -Lactosemonohydrat und der gelösten α -Laktose, das zweite zwischen Letzteren und der β -Laktose. In Lösungen unterhalb der Löslichkeitsgrenze ist das erste Gleichgewicht, also der Übergang von Laktosemolekülen in die Lösung, der limitierende Faktor. Die Laktosekonzentration wurde bei 25°C mittels Refraktionsindex gemäss einer Kalibrationskurve bestimmt. Die Bindungskräfte an der Laktoseoberfläche wurden in früheren Arbeiten auf 98 kJ/mol geschätzt, falls nur die Hälfte der Wasserstoffbrücken aktiv ist. Die Lösungswärme von Laktose betrage 15.5 kJ/mol und die Autoren selbst berechneten für das Loslösen eines Laktosemoleküls von der Kristallstruktur einen Energieaufwand von 37 kJ/mol [Lowe, Paterson, 1998].

Die Geschwindigkeit der Auflösung bestimmt die „Wartezeit“ (Extraktionszeit) vor Titrationsbeginn. Zuerst erfolgt die Benetzung der Oberfläche, dann die Ablösung und Diffusion der Moleküle ins Lösungsmittel. Wegen der Drift sollte die Extraktionszeit nicht länger als 15 Minuten dauern, falls dieser Schritt in der Titrierzelle durchgeführt wird. Der Blindwert der Vorbereitung sollte bestimmt werden, damit er allenfalls berücksichtigt werden kann [Scholz, 1984]. Zur Vergrößerung der Oberfläche werden verschiedene Techniken vorgeschlagen: Zermörsern [Schulz, 1984], Ultraschall-Behandlung [Isengard] und Hochfrequenz-Zerkleinerung [DeCaro, 2001]. Letztere Methode wird auch von den Anbietern von KF-Titratoren empfohlen, und diese bieten Spezialhomogenisatoren für den Aufbau auf die Titrationszelle an. Als Vorteile der letzten Methode werden der Zeitgewinn, die Automatisierungsmöglichkeit, die tieferen Arbeitstemperaturen, die geringere Gefahr für eine Wasseraufnahme (Faktor Zeit und geschlossene Titrierzelle) sowie die

Möglichkeit, auf den Zusatz von Formamid oder Chloroform zu verzichten betont [DeCaro, 2001].

Faktoren, welche die Auflösungs-Geschwindigkeit beeinflussen [Gerhartz, 1985]:

- Temperatur
- Oberfläche des gelösten Stoffes (mechanische Zerkleinerung)
- Kristallisationsgrad
- Diffusionsgeschwindigkeit (Turbulenz, Affinität zum Lösungsmittel)

Kristalle von unterschiedlicher Erscheinungsform weisen unterschiedliche Auflösungseigenschaften auf, selbst wenn sie identische Zusammensetzungen aufweisen [Raghavan et al., 2002].

Die Probenzugabe ist bei Feststoffen manchmal problematisch. In den Versuchen der Semesterarbeit ist oftmals ein Teil der Probe am Schiff oder an der Öffnung der Titrierzelle kleben geblieben. Um einem Wassereintrag aus der Umgebungsluft vorzubeugen, sollte die Zelle nur kurz geöffnet werden. Die Belüftung des Arbeitsplatzes mit getrockneter Luft wird von Scholz empfohlen [Scholz, 1984]. Durch Rückwägen des Schiffes oder der Spritze erhält man die exakte Masse der eingewogenen Probe [DeCaro, 2001].

2 Material und Methoden

2.1. Material und Produkte

2.1.1. Arbeitssicherheit

Der Umgang mit zum Teil stark giftigen chemischen Produkten erfordert das Arbeiten in einer Laborkapelle mit Dampfabzug sowie den Einsatz von Latex-Handschuhen. Die Sicherheitsdatenblätter sind im Anhang 1 zusammengestellt.

2.1.2. Analyseprodukte

In Tabelle 6 ist die Zusammensetzung der analysierten Produkte dargestellt. Bei den Werten handelt es sich um die Angaben der Hersteller. Die Mager- und Vollmilchpulver sowie das Permeat- und das Proteinpulver wurden freundlicherweise von der Hochdorf Swiss Milk AG, Hochdorf CH zur Verfügung gestellt. Das Laktosepulver sta00t von der Molkerei Meggle, Wasserburg DE. Die Details zu den selbst hergestellten Mischungen und den postkristallisierten Mustern sind im Abschnitt 2.2.7 beschrieben.

Tabelle 6: Zusammensetzung der analysierten Trockenprodukte; die Werte sind in g/100g Produkt (Nassbasis) angegeben; * die Werte der Mischungen wurden theoretisch errechnet; CR ist der erwartete Kristallisationsgrad der Laktose

Bezeichnung	Laktose	Protein	Wasser	CR	Beschreibung, Art
MMP 1	54	33	3.7	5	Sprüh-Magermilchpulver (MMP)
MMP 2	54	33	3.3	10	Sprüh-MMP, mit Vitaminzusatz
MMP 3	54	33	3.5	5	Sprüh-MMP, agglomeriert
MMP 4	54	34	3.4	5	Sprüh-MMP, low heat
MMP 5	54	34	3.4	5	Sprüh-MMP, medium heat
MMP 6	54	34	2.4	5	Sprüh-MMP, medium high heat
MMP 7 *	56	34	2.7	90	Mischung (Permeat-, Proteinpulver)
MMP 25 *	54	33	3.8	19	Mischung (MMP 1, MMP 100)
MMP 50 *	54	33	4.0	38	Mischung (MMP 1, MMP 100)
MMP 75 *	54	33	4.1	56	Mischung (MMP 1, MMP 100)
MMP 100	54	33	4.3	75	Vorkristallisiert, gesprüht
Post 1	54	33	-	-	Postkristallisiertes Sprühpulver
Post 2	54	33	-	70	Postkristallisiertes Sprühpulver
Post 3	54	33	-	-	Postkristallisiertes Sprühpulver
Post 4	54	33	-	10	Postkristallisiertes Sprühpulver
Post 5	54	33	-	40	Postkristallisiertes Sprühpulver
VMP 1	41	25	1.9	25	Walzen-Vollmilchpulver
VMP 2	41	26	0.5	20	Walzen-Vollmilchpulver
VMP 3	40	25	2.5	15	Sprüh-Vollmilchpulver
α LM	99	-	5.1	99	Laktose α -Monohydrat
Permeatpulver	89	3	1.1	95	Vorkristallisiertes Sprühpulver
Proteinpulver	6	82	5.2	5	Sprühpulver

2.1.3. Karl-Fischer-Titration

- KF Processor 658 (Metrohm, Herisau, CH)
- Dosimat 665 (Metrohm, Herisau, CH)
- Magnetrührer mit Heizung IKA RCT basic mit Thermostat IKA Tron ETS-D (Blanc-Labo SA, Lonay, CH)
- Titrierzelle mit Seitenöffnung und Verschlusszapfen (Metrohm, Herisau, CH)
- Scorex Dispenser 521
- Wägeschiff aus Kunststoff mit Schutzhülle
- Analysewaage Mettler AE 240, Nr. K10097 (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- 5ml-Einwegspritzen mit Kanülen
- Porzellan-Mörser
- Teflon-Abdichtband

- Methanol, Nr. PT 4600.251 (Pharmacochimie SA, Delémont, CH)
- Methanol LiChrosolv, Art-Nr. 1.06018.2500, Lot K36193718 (Merck, VWR International AG, Dietikon, CH)
- Hydranal Methanol dry, Art-Nr. 34741, Lot 7186D (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Composite 5, Art-Nr. 34805, Lot 6331B (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Composite 5, Art-Nr. 34805, Lot 7162B (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Solvent, Art-Nr. 34800, Lot 7078A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Solvent, Art-Nr. 34800, Lot 7222B (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Solvent, Art-Nr. 34800, Lot 7240A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Titrant 2, Art-Nr. 34811, Lot 6279E (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Titrant 5, Art-Nr. 34801, Lot 70170 (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Titrant 5, Art-Nr. 34801, Lot 7169A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Dimethylsulfoxid, Fluka Nr. 41640, Lot 425864/1 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)
- Formamid, Fluka Nr. 47680, Lot 1081438 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)
- Hydranal Formamid dry, Art-Nr. 34724, Lot 7145A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Triton X-100, Fluka Nr. 93426, Lot 1310908 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)
- Chloroform PA CAS 67-66-3, Lot 14.0440604.400 (Pharmacochimie SA, Delémont, CH)
- Hydranal Eichstandard 5.00, Art-Nr. 34813, Lot 7050B (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Argon komprimiert UN1006 (PanGas, Dagmersellen, CH)

2.1.4. Isothermische Bestimmung der Löslichkeit

- Magnetrührer mit Heizung IKA RCT basic mit Thermostat IKA Tron ETS-DH fuzzy (IKA Labortechnik, Staufen, D)
- Magnetrührer mit Heizung IKAMAG RET-GS mit Thermostat IKA Tron ETS-D (IKA Labortechnik, Staufen, D)
- Waage Mettler Typ PM480 Delta Range (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- 100 ml Bechergläser

- Methanol, Nr. PT 4600.251 (Pharmacochimie SA, Delémont, CH)
- Methanol LiChrosolv, Art-Nr. 1.06018.2500, Lot K36193718 (Merck, VWR International AG, Dietikon, CH)
- Hydranal Methanol dry, Art-Nr. 34741, Lot 7186D (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Hydranal Solvent, Art-Nr. 34800, Lot 7078A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Dimethylsulfoxid, Fluka Nr. 41640, Lot 425864/1 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)
- Formamid, Fluka Nr. 47680, Lot 1081438 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)
- Hydranal Formamid dry, Art-Nr. 34724, Lot 7145A (Riedel de Haen, Seelze, DE)
- Triton X-100, Fluka Nr. 93426, Lot 1310908 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)

2.1.5. Bestimmung des Massenverlustes im Trockenschrank

- Trockenschrank WTB Binder, Typ F115, Nr. 88082 (Müller + Krempel, Bülach, CH)
- Trockenschrank Memmert, Typ ULE 500 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE)
- Analysewaage Mettler AE 240, Nr. K10097 (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- Wägegäler mit Schliff und Glasdeckel NS 60/30, Art-Nr. 611-9306 (VWR International AG, Dietikon, CH)
- Exsikkator mit Silika-Gel
- Quarzsand für Trockenschrankanalysen

2.1.6. Thermogravimetrische Analyse (TGA)

- Analysegerät Mettler TC15 mit Heizelement Mettler TG50 (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- Analysewaage Mettler M3, Genauigkeit 0.1 µg (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- 70 µl Schmelztiegel aus Aluminiumoxid
- STAReSoftware (Mettler Toledo, Nänikon, CH)

2.1.7. Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

- Analysegerät Mettler DSC821^e (Mettler Toledo, Nänikon, CH)
- Analysewaage Mettler M3, Genauigkeit 0.1 µg (Mettler Toledo, Nänikon, CH)

- 40µl Aluminiumtiegel
- STAReSoftware (Mettler Toledo, Nänikon, CH)

2.1.8. Near Infrared Absorbptions-Spektroskopie (NIR)

- Spektrometer NIRLab N-200 MCS100 mit Software NIRLab Operator (Büchi Labortechnik AG, Flawil, CH)

2.1.9. Mikroskopie

- Mikroskop Olympus BX41 mit Polarisationsfilter (Olympus, Volketswil, CH)
- Objektträger aus Glas (Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, DE)
- Abdeckplättchen aus Glas, Format 18x18 mm
- Glycerin 98% (w/w) (Siegfried Pharma, Zofingen, CH)

2.1.10. Herstellung von Proben mit kristalliner Laktose

- Labormischer Turbula System Schatz (Willy A. Bachofen, Basel, CH)

2.1.11. Kristallisation der Laktose in Milchpulver (Post-Kristallisation)

- Klimaschrank Labotest, Nr. C430K5 (Mazzali s.n.c., Monza, IT)
- Trockenschrank Memmert, Typ ULE 500 (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, DE)
- Rechteckige Metallschubladen
- Vakuum-Verpackungsmaschine VC999 (Inauen Maschinen AG, Herisau, CH)
- Kochfeste Vakuumbbeutel

2.1.12. Herstellung von isohumidem Probematerial

- Messgerät a_w -Sprint TH-500 (Novasina AG, Lachen, CH)
- Wägegläser mit Schliff und Glasdeckel NS 60/30, Art-Nr. 611-9306 (VWR International AG, Dietikon, CH)
- Porzellan-Mörser
- Exsikkator
- Kristallisierschale mit demineralisiertem Wasser
- Kalium-Acetat, purum 99%, Fluka-Nr. 60034, Lot 1200794-50306118 (Sigma-Aldrich, Buchs, CH)

2.1.13. Bestimmung des Raumklimas

- Temperatur- und Luftfeuchtigkeitssonde EcoLog TH1, Nr. 63269 (Elpro AG, Buchs, CH)

2.2. Methoden

2.2.1. Optimierung, Validierung und Statistik

Da diese Prozesse miteinander verknüpft sind, werden das allgemeine Vorgehen für die Optimierung und die Validierung in einem gemeinsamen Abschnitt beschrieben. Die verwendeten Begriffe werden am Ende des Abschnitts vor den Erklärungen zu den statistischen Auswertungen definiert.

2.2.2. Allgemeiner Optimierungsprozess

Folgende allgemeine Vorgehensweise wurde für die Optimierung (kontinuierlicher Verbesserungsprozess) praktiziert [Box, 2005]:

1. Idee (Hypothese)
 2. Ausprobieren (Deduktion)
 3. Beobachten und Beschreiben; Ursachenanalyse (PAMRU-Methode, siehe unten)
 4. Auswertung, Schlussfolgerungen (Induktion)
-
1. Anpassung der Methodik (Hypothese)
 2. Umsetzung der veränderten Methodik (Deduktion)
 3. Auswertung des Erfolgs, Überprüfen der Hypothesen (Induktion)
 4. Wiederholen der obigen Schritte

Faktoren der Ursachenanalyse, abgeändert nach [Blanc, 2005]:

Personal	(Mensch, Beobachter)
Anleitungen	(Methode, SOP)
Maschine	(Messapparat)
Ressourcen	(Material, Probe)
Umwelt	(z.B. Luftfeuchtigkeit)

2.2.2.1. Validierung der Analysemethode

Es existieren viele Definitionen, was Validierung sein sollte. In dieser Arbeit halten wir uns an die folgende: Validierung ist die Prüfung einer Methode hinsichtlich deren Eignung, die vorgesehene Aufgabe gemäss den gestellten Anforderungen zu erfüllen. Dazu muss die Methode genau bekannt und möglichst detailliert beschrieben sein und die geforderten Leistungsmerkmale müssen qualitativ und quantitativ definiert sein. Für Letzteres eignet sich die Form eines Pflichtenheftes oder einer Spezifikation. Die Validierung vergleicht schliesslich die gemessenen Leistungsmerkmale mit den vorher definierten Sollwerten. Falls die Merkmale übereinstimmen, so ist die Methode für den vorgesehenen Zweck geeignet. Falls nicht, muss entweder die Methode oder die Aufgabenstellung angepasst werden oder man sucht eine andere Methode [Kromidas, 2000].

Die Validierung der Analysemethode erfolgt gemäss Pflichtenheft (Anhang 2), welches vom Beauftragten im Rahmen der Semesterarbeit [Glanzmann, 2007] in Absprache mit dem Auftraggeber erstellt worden ist. Geringfügige Anpassungen wurden noch zu Beginn der Diplomarbeit vorgenommen. Dieses Pflichtenheft soll dazu beitragen, dass eine für diesen spezifischen Zweck geeignete Analysemethode gefunden und bezüglich der konkreten Anwendung in den Hochdorf Gesellschaften geprüft und beurteilt werden kann.

Für die Validierung der Analysemethode werden zudem die folgenden Kriterien beurteilt [Roos, 2004]:

Wiederholpräzision
Laborpräzision
Wiederholgrenze
Richtigkeit
Methodenfehler
Resultate-Unsicherheit

2.2.2.2. Begriffe und Definitionen

Im Folgenden werden die zur Validierung herangezogenen Begriffe definiert [Kromidas, 2000]:

- Wiederholpräzision (= Standardabweichung von mehrmaliger Analyse der selben Probe, am selben Tag, vom selben Beobachter mit der selben Apparatur)
- Laborpräzision (= Standardabweichung wie bei Wiederholpräzision, jedoch Messungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt)
- Wiederholgrenze = Konfidenzintervall (siehe unten)
- Der Methodenfehler wird gemäss Gleichung 2 berechnet.

Gleichung 2: Berechnung des Methodenfehlers

$$\text{Methodenfehler} = \frac{\text{Standardabweichung} * 100\%}{\text{Mittelwert}}$$

- Abschätzen der Resultate-Unsicherheit:
Um die zu erwartende Genauigkeit der Methoden abschätzen zu können, werden die Fehler ihrer Einzelschritte addiert.

2.2.2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Resultate erfolgte mit der Anwendung Microsoft Office Excel 2003 gemäss untenstehender Methodik [Grogg, 2004], [Looser, 2003], [Kromidas, 2000]. Wurden die in Excel enthaltenen Funktionen verwendet, so wird nur die Syntax der Funktion beschrieben, und es wird auf die genaue Angabe der Gleichung verzichtet. Die verwendeten Funktionen von Excel sind *kursiv* angegeben.

Beispiel: =*Funktion*(*Datenbereich*)

a) Beschreibung der Stichprobe / Punktschätzung des Erwartungswertes

Mittels der nachfolgenden Berechnungen werden die Lage und die Streuung einer **normal verteilten Stichprobe** charakterisiert:

- Schätzung des **Mittelwertes**: =*Mittelwert*(*Bereich*)
- Schätzung der **Standardabweichung**: s=*STABW*(*Bereich*)
- Schätzung der **Standardabweichung des Mittelwertes**:
 $s_x = \text{STABW}(\text{Bereich}) / (\text{Anzahl}(\text{Bereich})^{(1/2)})$
- **Resultate-Angabe**: Mittelwert \pm s_x

- **Konfidenzintervall:** $=TINV(\alpha; df) * s_x$; $\alpha=5\%$
- Bestimmung der **Freiheitsgrade:** $df=Anzahl(Bereich)-1$

Mittels der nachfolgenden Berechnungen werden die Lage und die Streuung nach der **robusten Statistik** (für nicht normal verteilte Daten) charakterisiert:

- Schätzung des **Median:** $=Median(Bereich)$ oder $=Quartile(Bereich;2)$
- Schätzung des **halben Quartilen-Intervalls:**
 $ISIQ=Quartile(Bereich;3)-Quartile(Bereich;1)/2$
- Schätzung der **Standardabweichung:** $s_{ISIQ} = 2^{1/2}(ISIQ)$
- Schätzung der **Standardabweichung des Mittelwertes:**
 $s_x = s_{ISIQ} / (Anzahl(Bereich)^{(1/2)})$
- **Resultate-Angabe:** Mittelwert $\pm s_x$
- **Konfidenzintervall:** $=TINV(\alpha; df) * s_x$; $\alpha=5\%$
- Bestimmung der **Freiheitsgrade:** $df=Anzahl(Bereich)-1$

b) Ausreisser

Besteht der Verdacht auf einen Ausreisser, so wird ein Dixon-Test durchgeführt [Kromidas, 2000]. Ein Wert, welcher mit 95% Wahrscheinlichkeit ein Ausreisser ist, wird ersatzlos gestrichen.

c) Anpassungstest

Theoretisch liegen Resultate der analytischen Chemie, welche nur zufällige Fehler aufweisen, in der Form einer Normalverteilung vor. Falls die Ergebnisse der Symmetrie- und Steilheitsmessungen zwischen - 0.5 und + 0.5 liegen, kann deshalb auf die Durchführung des Anpassungstestes verzichtet werden.

- Symmetriemessung der Verteilung: $=Schiefe(Bereich)$
- Steilheitsmessung der Verteilung: $=KURT(Bereich)$

Falls die Symmetrie und die Steilheit der Verteilung ausserhalb des geforderten Bereichs von -0.5 bis + 0.5 liegen, so wird ein Anpassungstest nach Kolmogoroff und Smirnow durchgeführt.

d) Lineare Regression

Die lineare Regression wurde mit Office Excel 2003 durchgeführt. Die Standardabweichung der Residuen wurde gemäss Gleichung 3, der Vertrauensbereich gemäss Gleichung 4 berechnet [Grogg, 2004].

Gleichung 3: Berechnungsformel für die Standardabweichung der Residuen

$$s(yx) = \sqrt{\frac{\sum (y - y_i)^2}{N - 2}}$$

Mit: $s(yx)$ Standardabweichung der Residuen; y effektiver Kristallisationsgrad; y_i mit Modell berechneter Kristallisationsgrad; N Anzahl Messpunkte

Gleichung 4: Berechnungsformel für den Vertrauensbereich

$$s(y) = \pm \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{(xi - x)^2}{\sum (xi - x)^2}} * s(yx)$$

Mit: $s(y)$ Vertrauensbereich für einen berechneten Kristallisationsgrad; xi Ausgangswert für die Berechnung (Kristallwasser oder Wassergehalt, je nach Modell); x arithmetischer Mittelwert aller dem Modell zu Grunde liegenden Ausgangswerte (xi); N Anzahl Messpunkte; $s(yx)$ Standardabweichung der Residuen

Mittels polynomischer Regression 2. Grades wurde eine Gleichung für die Berechnung des Vertrauensbereichs für alle berechneten Kristallisationsgrade erstellt. Der Vertrauensbereich wird auf Basis des Ausgangswertes für die Berechnung (Kristallwasser oder Wassergehalt, je nach Modell) berechnet.

2.2.3. Optimieren der Karl-Fischer-Titration

Im Folgenden sind die spezifischen Methoden beschrieben, welche innerhalb der Verbesserungszyklen für die KF-Titration angewendet wurden. Falls nicht anders vermerkt, so wurde die KF-Titration gemäss der ersten Fassung der KF-Standard-Methode (Anhang 3) durchgeführt.

2.2.3.1. Isothermische Bestimmung der Löslichkeit

Eine Methode zur Bestimmung der Löslichkeit von Laktose [Brito, Giulietti, 2007] wurde folgendermassen abgeändert:

- a) Exakt ungefähr 0.10g bis 0.25g Laktosepulver einwiegen und zusammen mit einem Rührstab in einen Becher vorlegen
- b) 5ml bis 10ml Lösungsmittel zugeben und das Rührwerk einschalten
- c) 1-3 Minuten warten, um das Gleichgewicht einzustellen
- d) Zugabe von weiteren 2ml bis 5ml Lösungsmittel und Einstellung des Gleichgewichts abwarten (2-3 Minuten)
- e) Fortsetzung der Lösungsmittel-Zugabe wie unter Punkt d), bis alle Kristalle aufgelöst sind und die Lösung klar ist (echte Lösung). Das Resultat lautet „vollständig aufgelöst in x ml Lösungsmittel“.
- f) Wird die vollständige Auflösung auch mit 60ml Lösungsmittel noch nicht erreicht, so ist der Versuch abzubrechen. Das Resultat lautet dann „Nicht vollständig aufgelöst“ in 60 ml Lösungsmittel.

Tabelle 7 zeigt die Planung der Löslichkeitsexperimente. Mit Ausnahme des Gemischs Methanol/DMSO handelt es sich um Lösungsmittel, welche bei der KF-Titration verwendet werden.

Tabelle 7: Versuchsplanung für die Bestimmung der Löslichkeit von α -Laktosemonohydrat in verschiedenen Lösungsmitteln

Temperatur	Lösungsmittel
21°C	Methanol
	Methanol + 3 Tropfen Triton X-100
	Hydranal Solvent
	Methanol/DMSO (2:1) (v:v)
	Methanol/Formamid (2:1) (v:v)
	Methanol/Formamid (5:1) (v:v)
40°C	Hydranal Solvent
	Methanol/Formamid (5:1) (v:v)
	Methanol/Formamid (10:1) (v:v)
55°C	Methanol + 3 Tropfen Triton X-100
60°C	Methanol

2.2.3.2. Drift-Optimierung

Die Beurteilung des Eintrags von Wasser in die Titrationszelle aus der Umgebung (Drift) erfolgte gemäss Standard-Methode (Anhang 3). Nebst dem Abdichten der Titrationszelle mit Teflonband wurde als Verbesserungsmethode auch das Befüllen der Zelle mit Argon ausgetestet.

2.2.3.3. Faktorbestimmung

Die Faktorbestimmung erfolgte gemäss Standard-Methode SOP_07-09-25 und wurde jeweils drei bis acht Mal durchgeführt. Ab Anfang November wurde sie gemäss der Methode SOP_07-11-02 durchgeführt.

2.2.3.4. Verbesserung der Einwaage

Die Einwaage erfolgte zuerst ohne Uhrglas. Nach dem entsprechenden Versuch erfolgte sie gemäss Standard-Methode SOP_07-09-25 mit Uhrglas.

2.2.4. Optimierung der Trockenschrank-Methode

2.2.4.1. Zusatz von Quarzsand

Beim ersten Versuch wurden 14 Messungen mit dem Pulver MMP 3 durchgeführt. Bei der Hälfte der Probe wurden vor der Einwaage ca. 5 Gramm Quarzsand vorgelegt und die Waage danach wieder tariert. Nach erfolgter Einwaage wurde der Sand mit einem Metallspachtel mit der Probe gleichmässig vermischt. Die weiteren Schritte erfolgten gemäss Punkt 2.2.8.2. Das Vorgehen wurde mit einer weiteren Serie mit den Pulvern MMP 1 (6 Messungen) und MMP 7 (8 Messungen) analog wiederholt.

2.2.4.2. Reihenfolge des Wägens

Beim Wägen wurde die Reihenfolge der Nummern notiert. Die Darstellung der Serien (2 x 7 Messungen) erfolgte mit der Grafik-Funktion in Office Excel 2003. Die Auswertung erfolgte von Auge. Folgen fünf oder mehr Messpunkte derselben Tendenz (steigend oder sinkend), so wird ein Verdacht auf Drift geäußert. Der Versuch wurde wiederholt.

2.2.4.3. Temperaturschwankungen des Trockenschrank

Es wurden 21 Serien im Trockenschrank WTB Binder und 11 Serien im Trockenschrank Memmert gemäss Punkt 2.2.8.2 analysiert. Von einer Probe wurden jeweils mindestens drei parallele Messungen durchgeführt.

2.2.4.4. Einwägen der Tara

Zum Vergleich wurden je 5 Proben in dreifacher Wiederholung analysiert. Beim Wägen der Tara wurde die Stabilität des Messwertes beurteilt.

2.2.5. Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat

2.2.5.1. Modell nach Schuck und Dolivet

Zur Berechnung des Anteils an kristalliner Laktose wird die Berechnungsmethode von Schuck und Dolivet [Schuck, Dolivet, 2002] mit folgenden Anpassungen angewendet: Das Gesamtwasser wird mittels KF-Titration bestimmt. Der Masseverlust im Trockenschrank wird nicht bei 102°C, sondern gemäss unten stehender Methodik bei 87°C bestimmt. Als Milchsatzlösungsmenge wird der Aschegehalt angenommen. Der Gehalt an Fett, Protein, Laktose und Asche wird nicht selber analysiert, sondern aus den Analyserapporten oder den Produktespezifikationen der Lieferanten entnommen. Der Kaseingehalt von Mager- und Vollmilch wird auf 82%, der Molkeeiweiss-Gehalt auf 18% des Gesamteiweisses festgelegt [Töpel, 2004].

2.2.5.2. Modell nach Roetman

Zur Berechnung des Anteils an kristalliner Laktose wird die Berechnungsmethode von Roetman für Magermilchpulver ohne Änderungen angewendet [Roetman, 1982a].

2.2.5.3. Anpassung eines neuen Modells

Es wurden zwei neue Modelle ausprobiert, eines mit Blindwertkorrektur und eines mittels linearer Regression. Für beide Modelle wurden zuerst für alle Proben die Differenz zwischen der KF-Titration und dem Massenverlust im Trockenschrank berechnet (Zwischenresultat = KF-TS).

Beim ersten Berechnungs-Modell wurde aus den Zwischenresultaten (KF-TS) der Pulver MMP 1, MMP 2, MMP 3, MMP 4, MMP 5 und MMP 6 ein Blindwert (arithmetischer Mittelwert) berechnet. Dieser Blindwert wurde nun bei sämtlichen Zwischenresultaten in Abzug gebracht (neue Zwischenresultate = CW). Der Kristallisationsgrad wurde gemäss Gleichung 5 berechnet.

Gleichung 5: Berechnungsformel für den Kristallisationsgrad (CR) von Laktose; CW Kristallwasser

$$CR[\%] = \frac{CW[\%] * 19 * 100\%}{Laktosegehalt[\%]}$$

Für das zweite Modell wurde mit den Zwischenresultaten der Pulver MMP 1, MMP 25, MMP 50, MMP 75 und MMP 100 und den geschätzten Kristallisationsraten gemäss Tabelle 6 eine lineare Regression in Office Excel 2003 durchgeführt. Mit den so erhaltenen Koeffizienten wurden die Kristallisationsraten aller Pulver mit den Zwischenresultaten (KF-TS) berechnet.

2.2.5.4. Ausarbeitung einer neuen Analyseverfahren

- Suchen von Eigenschaften, welche sich mit einfachen analytischen Methoden bestimmen lassen und welche Proben mit vorwiegend amorpher Laktose von solchen mit kristalliner Laktose deutlich unterscheiden
- Beurteilung der Präzision der Analyseverfahren für die gefundene Eigenschaft
- Herstellen einer Korrelation der Analyseverfahren mit der Eigenschaft mit Hilfe einer Kalibrationsreihe
- Entwickeln eines neuen Modells oder anpassen eines bestehenden Modells
- Abschätzen der Resultateunsicherheit der Methode mittels Addition der möglichen Fehler der Einzelschritte

2.2.5.5. Herstellung von isohumidem Probematerial

- Pro Sorte werden ein bis zwei Wägegläser vorbereitet
- 1.5 bis 2.5 Gramm Pulver werden lose in die Wägegläser gegeben
- Die Wägegläser werden während mindestens einer Woche äquilibriert
- Der a_w -Wert der Proben wird vor der KF-Titration gemessen

2.2.5.6. Differential Scanning Calorimetrie (DSC)

- Die DSC-Bestimmungen wurden im Temperaturbereich von 20°C bis 240°C mit 5°Cmin⁻¹ durchgeführt.

2.2.5.7. Near Infrared Absorptions-Spektroskopie (NIR)

- die gut durchmischte Probe ca. 5mm hoch in die Analyseschale einfüllen
- Scan im Bereich der Wellenfrequenzen von 4000cm⁻¹ bis 7500cm⁻¹
- Auswertung mit Software NIRLab Operator

2.2.6. Validierung der KF-Titration

2.2.6.1. Beurteilung der Richtigkeit

Zur Beurteilung der Richtigkeit der Wasser-Bestimmungen wurden einerseits Extraktionskurven aufgezeichnet und ausgewertet, andererseits wurden die Resultate mit den Ergebnissen einer Referenzmethode verglichen. Die Extraktionsdauer wird auf zehn bis fünfzehn Minuten fixiert. Der Verbrauch des Titrationsmittels wird in einer Grafik gegen die Zeit aufgetragen. Die Faktoren Lösungsmittel und Extraktionstemperatur werden variiert.

Als Referenzmethode zur Bestimmung des Wassers in α -Laktosemonohydrat wurde der Massenverlust bei 120°C während 16 Stunden analysiert [Listiohadi, 2005].

2.2.6.2. Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Die TGA-Bestimmungen wurden im Temperaturbereich von 25°C bis 180°C, teilweise bis 240°C mit 5°Cmin⁻¹ durchgeführt. Ein Versuch wurde mit einer Rate von 2° Cmin⁻¹ durchgeführt.

2.2.6.3. Trockenschrank mit Restwasser-Bestimmung mit KF-Titration

Die bei 120°C während 16 Stunden getrockneten Proben wurden im Exsikkator abgekühlt. Der Restwasser-Gehalt wurde mittels KF-Titration gemäss SOP_2007-09-25 analysiert.

2.2.6.4. Mikroskopie

- Sehr wenig Pulver wird in Glycerin auf dem Objektträger dispergiert und mit einem Glasplättchen zugedeckt.
- Betrachtung im polarisierten Licht mit 100-facher und eventuell 400-facher Vergrösserung; der Filter wird gedreht, bis der Hintergrund schwarz erscheint.
- Beurteilung des Kristallgehalts durch Vergleich mit kristallinem Laktosepulver. Die Kristalle brechen das Licht anders als die restlichen Bestandteile und erscheinen als hell leuchtende Flecken oder Punkte. Die erleuchtete Fläche im Sehfeld wird abgeschätzt und erlaubt eine semi-quantitative Aussage über den Kristallisationsgrad im Milchpulver. Dazu werden minimale und maximale Flächenanteile an der Gesamtfläche verschiedener Partikel abgeschätzt und mit Pulvern mit bekanntem Kristallisationsgrad verglichen.

2.2.7. Herstellung von Proben mit kristalliner Laktose

2.2.7.1. Mischprobe aus Permeat- und Proteinpulver

- Einwaage von 118,3 Gramm Proteinpulver und 181,8 Gramm Permeatpulver
- Die Probe wird während 15 Minuten mit dem Turbula Mischer gemischt.
- Dies ergibt die Probe MMP 7

2.2.7.2. Kristallisation der Laktose in Milchpulver (Post-Kristallisation)

- Auf jeder Schublade werden ein bis zwei Suppenkellen MMP 1 lose verteilt.
- Die Solltemperatur und die relative Luftfeuchtigkeit werden auf die Sollwerte eingestellt. Nach Ablauf der Expositionszeit werden die Muster entnommen, mit einer Kelle gemischt und in hitzebeständige Vakuumsäcke abgefüllt. Die Stärke des Unterdrucks wird auf die niedrigste Stufe eingestellt (Stufe 1 auf Skala von 1 bis 10).
- Die detaillierten Versuchsbedingungen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Versuchsbedingungen für die postkristallisation von Magermilchpulver

Probe	RH [%]	T1 [°C]	t1 [min]	T2 [°C]	t2 [min]
Post 1	90	25	120	70	30
Post 2	90	25	180	70	60
Post 3	50	55	100	70	70
Post 4	50	55	150	70	70
Post 5	50	55	150	70	150

2.2.8. Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat

2.2.8.1. Karl-Fischer-Titration

Die Wasserbestimmung wurde gemäss der in der Optimierungsphase entwickelten Standard-Methode SOP_2007_11_02 durchgeführt.

2.2.8.2. Bestimmung des Massenverlustes im Trockenschrank

Nachfolgend ist das Vorgehen zur Bestimmung des Massenverlustes im Trockenschrank beschrieben. Es sollte mit Handschuhen gearbeitet werden.

- Die Glasgefässe werden gemäss der Versuchsplanung nummeriert und während einer Stunde bei 87°C konditioniert. Das Konditionieren erfolgt mit offenem Deckel. Vor dem Herausnehmen werden die Gefässe mit dem Deckel geschlossen. Das Abkühlen erfolgt im Exsikkator über Silika-Gel während mindestens 30 Minuten.
- Das Wägen erfolgt mit einer Analyse-Waage, welche die Masse auf 0.1mg genau anzeigt. Als erstes wird die Tara des verschlossenen Behälters gewogen und notiert. WICHTIG: Die Behälter dürfen erst nach dem Wägen der Tara geöffnet werden, da ansonsten das Vakuum zu früh gelöst und somit die Tara verfälscht wird.
- Der Deckel wird nun entfernt und die Waage auf Null gestellt. Nun werden ungefähr 3 Gramm Probe exakt eingewogen und die Masse notiert. (Bei den entsprechenden Versuchen wurden an dieser Stelle dem Pulver ca. 5 Gramm Quarzsand zugesetzt und alles sorgfältig vermischt). Der Deckel wird nun bis zu Beginn der Analyse im Trockenschrank aufgesetzt.
- Die Probe-Serien werden mit offenem Verschluss in den Trockenschrank gestellt. Die Deckel müssen sorgfältig abgehoben werden, da durch ruckartige Luftwirbel Probe verschüttet werden kann. Es wird darauf geachtet, dass sich nicht alle Proben desselben Pulvers in der gleichen Ecke des Trockenschrankes befinden.

- Der Trockenschrank wird geschlossen und bis zum Ablauf der Trocknungszeit von 6 Stunden nicht mehr geöffnet. Die Trocknungstemperatur wird mittels einer Temperatursonde automatisch oder manuell kontrolliert.
- Die Klappe für die Frischluftzufuhr wird beim Trockenschrank WTB Binder vollständig geöffnet, beim Modell Memmert wird die Klappe auf die Stufe 3 der Skala von 1 bis 6 eingestellt.
- Nach Ablauf der Trocknungszeit werden die Proben im Exsikkator während mindestens 30 Minuten über Silika-Gel abgekühlt und dann zurückgewogen. Die Masse wird auf 0.1 mg genau notiert.

Die Berechnung des Trocknungsverlustes erfolgt gemäss Gleichung 6. Die Resultate werden in g/100g angegeben.

Gleichung 6: Berechnung des Trocknungsverlustes im Trockenschrank

$$\text{Tara [g]} + \text{Einwaage [g]} - \text{Rückwaage [g]} / \text{Einwaage [g]} * 100$$

2.2.9. Bestimmung des Raumklimas

- Die Messsonden werden am Arbeitsplatz fix installiert. Es werden ein bis zwei Mal täglich die Raumtemperatur sowie die relative Luftfeuchtigkeit abgelesen und notiert.

2.2.10. Literatur- und Patent Recherche

Die Literaturrecherche wurde wie in der Semesterarbeit beschrieben weitergeführt und aktualisiert [Glanzmann, 2007]. Es kamen neue Stichworte hinzu. Die Details der veränderten Suchabfragen sind bei den Resultaten in Kapitel 3 aufgeführt.

3 Resultate

3.1. Statistische Auswertung

Es wurden 15 Resultate der KF-Titration von Magermilchpulver MMP1 auf Ausreisser und Normalverteilung untersucht. Die Serie weist keinen Ausreisser auf und ist nicht normalverteilt. Bei beiden Tests beträgt das Fehlerrisiko ersten Grades fünf Prozent, das Risiko zweiten Grades ist unbekannt.

Der Median der untersuchten Messreihe ist um ein Viertel Prozent kleiner als der Mittelwert, die robuste Standardabweichung ist um 56% geringer als die Standardabweichung nach Gauss. Bei weiteren Untersuchungen bestätigten sich die systematisch tieferen Standardabweichungen der „robusten“ Berechnungsmethode. Die Werte waren jeweils um 51%, 55%, 93%, 98% und 99% kleiner als die Standardabweichung nach Gauss. Um nicht eine zu gute Standardabweichung vorzutäuschen, wurde fortan die statistische Auswertung wie bei einer Normalverteilung vorgenommen und auf eine Überprüfung auf Normalverteilung gänzlich verzichtet.

3.2. Optimierung der Karl-Fischer-Titration

3.2.1. Löslichkeit von α -Laktose-Monohydrat

Eine vollständige Auflösung der Laktosekristalle in der Menge der üblichen Einwaage für die KF-Titration ist nur bei erhöhten Temperaturen und nur in Lösungsmittelgemischen möglich (Tabelle 9). Geeignet sind Hydranal Solvent oder Methanol, welchem Lösungsvermittler wie DMSO oder Formamid zugegeben werden. Der Anteil des Lösungsvermittlers muss dabei mehr als fünfzehn Prozent betragen.

Tabelle 9: Löslichkeit von α -Laktosemonohydrat in Lösungsmitteln der KF-Titration bei unterschiedlichen Temperaturen

Lösungsmittel	Temperatur	Löslichkeit
Methanol	20°C	< 0.05g / 30 ml
	60°C	< 0.05g / 30 ml
Methanol mit Triton X-100	20°C	< 0.05g / 30 ml
	55°C	< 0.05g / 30 ml
Hydranal Solvent	20°C	0.12g / 30 ml
	40°C	0.20g / 30 ml
Met-OH/DMSO (2 :1 / v :v)	20°C	0.11g / 30 ml
Met-OH/Formamid (2 :1 / v :v)	20°C	0.40g / 30 ml
Met-OH/Formamid (5 :1 / v :v)	20°C	0.10g / 30 ml
	40°C	0.15g / 30 ml
Met-OH/Formamid (10 :1 / v :v)	40°C	< 0.10g / 30 ml

In reinem Methanol löst sich der Zucker auch bei 60°C nicht vollständig auf. Der Zusatz von Triton X-100 zu Methanol führt zu keiner Verbesserung der Löslichkeit. Im Methanol-Formamid-Gemisch sind bei 20°C rund 0.40 Gramm des kristallinen Milchzuckers löslich. In 30 ml Lösungsmittel Hydranal Solvent sind bei 40°C nur 0.20 Gramm α -Laktose-Monohydrat, bei 20°C nur noch 0.12 Gramm löslich.

3.2.2. Drift-Optimierung

Zu Beginn der Optimierung betrug die Drift zwischen zehn und fünfzig Mikroliter Titrationsmittel pro Minute. Es konnten keine Korrelationen mit der Luftfeuchtigkeit oder mit der Art des Lösungsmittels festgestellt werden, jedoch damit, ob vor Analysenbeginn eine längere oder nur eine kurze Konditionierung (Trocknung mit Titrationsmittel im Überschuss) durchgeführt wurde. Es zeigte sich auch, dass eine Wiederholung der Drift-Bestimmung oder die Bestimmung nach einer durchgeführten Titration deutlich tiefer ausfiel. Daraus konnte man auf eine Abhängigkeit von der Konditionierungszeit schliessen. Eine Korrektur der Drift bei den Resultaten erwies sich als schwierig, da sich der Verlauf nicht immer linear und zudem auf sehr unterschiedlichem Niveau bewegte. Nach der Einführung der systematischen Konditionierung während mindestens dreissig Minuten vor Messbeginn blieb die Drift auf konstant tiefem Niveau (Tabelle 10). Die Drift für das Lösungsmittel Hydranal Solvent wurde 34 Mal nach drei Minuten, 27 Mal nach sechs Minuten sowie 13 Mal nach zehn Minuten gemessen. Die Mittelwerte liegen zwischen 1.4 μ l/min. und 3.1 μ l/min. Die Standardabweichungen liegen zwischen 1.8 μ l/min. und 3 μ l/min.

Das Befüllen der Titrationszelle mit Argon brachte keine Verbesserung der Drift und wurde deshalb nicht in die Methode aufgenommen. Die Standard-Methode wurde entsprechend angepasst (Anhang 4). In der Methode wurde ein Grenzwert von $5\mu\text{l}/\text{min}$ für die Drift festgelegt. Falls die Drift grösser ist, muss versucht werden, durch besseres Schliessen und „Trocknen“ der Zelle die Drift unter den Grenzwert zu senken. Im Endresultat muss somit die Drift nicht korrigiert werden.

Tabelle 10: Mittelwerte der Driftmessungen mit dem Lösungsmittel Hydranal Solvent. s ist die Standardabweichung, n ist die Anzahl Messungen.

Dauer	3 min.	6 min.	10 min.	Einheit
Mittelwert	3.1	2	1.4	$[\mu\text{l}/\text{min.}]$
s	2.5	3	1.8	$[\mu\text{l}/\text{min.}]$
n	34	27	13	$[-]$

3.2.3. Optimierung der Einwaage

Das Einwägeschiff lässt sich wegen der langen Form und dem dickeren Haltegriff nicht schön zentriert auf der Waagschale platzieren [Abbildung 3]. Dieses Schiefe Auflegen führte zu unstabilen Messwerten (Drift). Durch das Unterlegen des Schiffes mit einem Uhrglas konnte der Schwerpunkt auf das Zentrum der Waagschale gerichtet werden [Abbildung 4]. Die Unstabilität beim Einwägen der Probe konnte mit dieser Massnahme behoben werden.

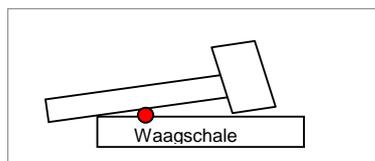


Abbildung 3: Das schiefe Auflegen des Probe-Wägeschiffes führt zu einer ungleichmässigen Belastung der Waagschale (dezentraler Schwerpunkt).

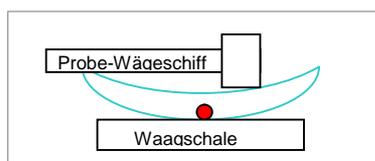


Abbildung 4: Uhrglas mit zentralem Schwerpunkt auf der Waagschale

Da sich die Einwägeschiffe aus Kunststoff hin und wieder elektrostatisch aufluden, führte dies zu unstabilen Einwaagen. Dieses Phänomen ist auf das Abreiben der Schiffe mit Haushaltspapier zurückzuführen. Es zeigte sich, dass es besser ist, das Einwägeschiff nicht nach jeder Analyse abzureiben, selbst wenn noch geringe Reste daran haften bleiben. Nach jeder Einwaage muss das Einwägeschiff wieder zurück gewogen und die Gewichts-differenz bei der Berechnung korrigiert werden.

3.2.4. Faktor-Bestimmung

Die geforderte Präzision wurde zu Beginn nicht erreicht. Eine mögliche Fehlerquelle war das Kondensat, welches sich an der Spritzennadel bei der Wasserzugabe bildet. Nach der Wasserzugabe wartet man daher zehn bis zwanzig Sekunden, bevor man die

Spritzenkappe wieder aufsetzt. Parallel dazu wurde die Arbeitstemperatur von 50°C auf 45°C abgesenkt, um die Dampfbildung etwas abzuschwächen.

Untersuchungen zeigen, dass Zweitbestimmungen im Lösungsmittel, in welchem bereits vorher eine Faktorbestimmung durchgeführt worden ist, systematisch tiefer ausfallen [Abbildung 5]. Der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Erstbestimmungen betragen 5.11 mg/ml und 0.01 mg/ml, jene der drei Zweitmessungen betragen 4.97 mg/ml und 0.06 mg/ml. Für jede Titerbestimmung muss deshalb neues Lösungsmittel in die Zelle vorgelegt werden.

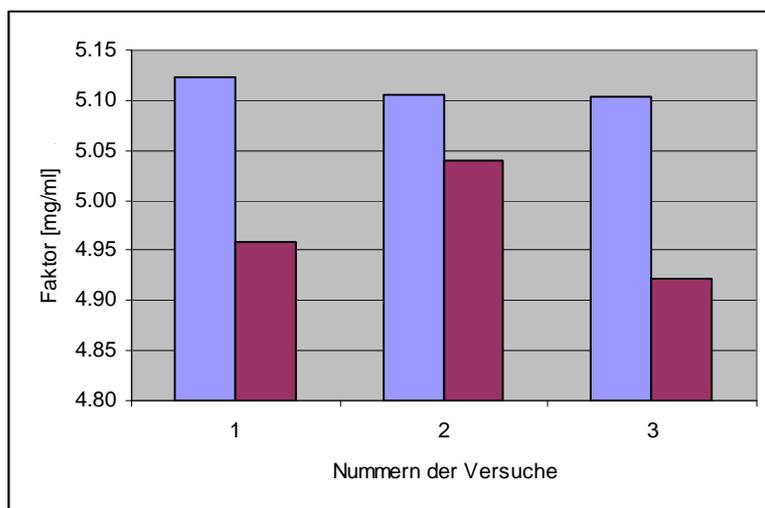


Abbildung 5: Resultate der Titerbestimmung: Erstbestimmungen mit neuem Lösungsmittel sind durch den blauen Balken dargestellt, die Zweitbestimmungen im „alten“ Lösungsmittel sind rot

Mit diesen Änderungen resultierten für die Faktorbestimmungen (dreifache Analyse) fortan Standardabweichungen zwischen 0.01 mg/ml und 0.05 mg/ml.

3.3. Optimierung der Trockenschrank-Methode

3.3.1. Zusatz von Quarzsand

Durch den Zusatz von Quarzsand zur Probe hat sich der Massenverlust bei allen untersuchten Proben vergrößert (Tabelle 11). Der Zuwachs beträgt 1% bis 4% im Vergleich zur Analyse ohne Sandzusatz. Bei zwei von drei Proben hat sich durch den Sandzusatz die Standardabweichung um 30% respektive um 170% vergrößert. Bei einer Probe ist die Standardabweichung um 50% kleiner geworden. Aufgrund dieser Resultate wurde bei den weiteren Analysen auf den Zusatz von Quarzsand verzichtet.

Tabelle 11: Bestimmung des Massenverlustes [g/100g] im Trockenschrank bei 87°C (6h) von Magermilchproben mit und ohne Zusatz von Quarzsand; s Standardabweichung, n Anzahl Messungen

Probe	ohne Sand		mit Sand		n
	Mittelwert	s	Mittelwert	s	
MMP 1	3.47	0.08	3.52	0.04	3
Vergleich	1.00	1.00	1.02	0.52	
MMP 3	3.58	0.04	3.73	0.12	7
Vergleich	1.00	1.00	1.04	2.66	
MMP 7	3.43	0.05	3.46	0.06	4
Vergleich	1.00	1.00	1.01	1.28	

3.3.2. Reihenfolge des Wägens

In Abbildung 6 und Abbildung 7 sind die Resultate der Bestimmung des Massenverlusts im Trockenschrank bei 87°C während 6 Stunden in der Reihenfolge des Auswägens dargestellt. In keiner der Serien ist eine Tendenz der Resultate zu erkennen. Die Resultate in Abbildung 6 weisen die grösseren Standardabweichungen auf. Bei dieser Serie erfolgte vor dem Trocknen ein Zusatz von Quarzsand zur Probe.

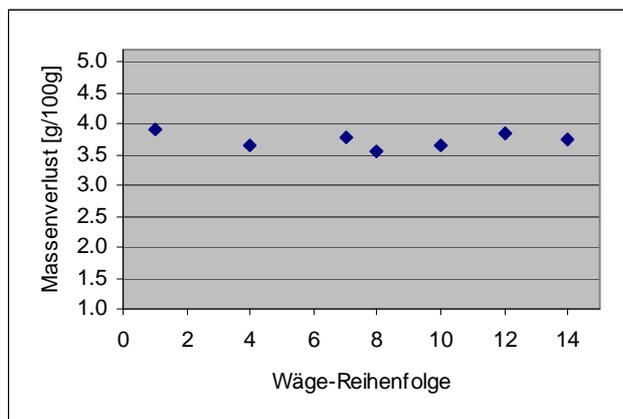


Abbildung 6: Resultate der Bestimmung des Massenverlusts im Trockenschrank in der Reihenfolge, in welcher das Wägen erfolgte

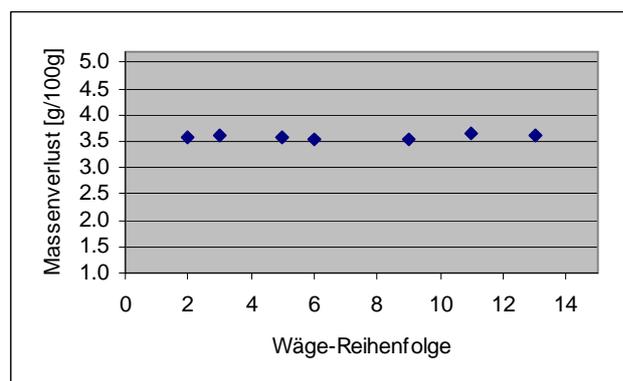


Abbildung 7: Resultate der Bestimmung des Massenverlusts im Trockenschrank in der Reihenfolge, in welcher das Wägen erfolgte

3.3.3. Temperaturschwankungen des Trockenschranks

Die Temperatur des Trockenschranks WTB Binder schwankte während den Analysen $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Deshalb wurden Vergleichs-Messungen in einem Memmert Schrank mit Schwankungen von $\pm 1^{\circ}\text{C}$ vorgenommen. Der Mittelwert der Standardabweichungen der Messresultate verringerte sich dadurch von 0.07 g/100g (n=21) auf 0.06 g/100g (n=11). Bei den Bestimmungen mit dem WTB Binder wiesen 52 Prozent der Messreihen Standardabweichungen grösser als 0.05 g/100g auf. Mit dem Trockenschrank Memmert sank dieser Anteil auf 27 Prozent.

3.3.4. Einwägen der Tara

Das Einwägen der Tara wurde zum Teil durch un stabile Massen erschwert. Es konnte eine Gewichtsdrift festgestellt werden. Dies war auf das Öffnen der Gefässe vor dem Wägen zurück zu führen, denn dadurch entspannte sich der Unterdruck im Gefäss,

welcher während des Abkühlens im Exsikkator entstand. Die Methode wurde so abgeändert, dass der Unterdruck keinesfalls vor dem Einwiegen der Tara gelöst werden darf. Danach lieferte das Einwiegen der Tara stabile Messwerte.

3.4. Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat

3.4.1. Bestimmung des stark gebundenen Wassers

Die Resultate der Bestimmung der Wassergehalte sind in Tabelle 12 dargestellt. Der Gehalt an fest gebundenem Wasser (CW) nimmt bei Proben mit höherem Kristallisationsgrad zu. Bei vorwiegend amorphen Proben liegen die Werte unter einem Prozent. Eine Ausnahme ist das Proteinpulver mit 1.5%. Laktose weist einen CW von 4.4% auf.

Tabelle 12: Resultate der Wasserbestimmung; CW fest gebundenes Wasser, TW Gesamtwasser (KF-Titration), FW Massenverlust im Trockenschrank, STABW Standardabweichung, n Anzahl Bestimmungen, v Trockenschrank WTB Binder, * einzelne KF-Titrationen mit nur 3 Minuten Extraktionszeit, ** nicht reproduzierbare Extraktionswerte

Werte in g/100g	CW (Ist)	TW	STABW	n	FW	STABW	n
Proteinpulver ^v	1.5	6.66	0.08	7	5.18	0.07	3
MMP 1	0.5	4.09	0.03	2	3.57	0.03	3
MMP 4 ^v	0.3	4.36	0.01	2	4.03	0.02	3
MMP 5 ^v	0.4	4.55	0.03	2	4.17	0.003	3
MMP 6 ^v	0.3	4.05	0.004	2	3.79	0.003	3
MMP 2	0.6	4.16	0.004	2	3.58	0.03	3
MMP 3 * ^v	0.7	4.24	0.06	7	3.58	0.04	7
MMP 25	0.8	4.91	0.03	4	4.14	0.03	2
MMP 50	1.2	5.67	0.01	3	4.52	0.05	3
MMP 75	1.3	6.41	0.01	4	5.08	0.03	3
MMP 100	1.6	7.22	0.05	7	5.58	0.08	6
MMP 7 ^v	2.8	6.16	0.03	3	3.32	0.16	7
Permeatpulver ^v	3.7	5.41	0.02	5	1.66	0.01	3
α LM ^v	4.4	5.06	0.03	4	0.62	0.20	3
Post 2	2.1	5.21	0.19	5	3.16	0.23	3
Post 4 * ^v	0.8	3.56	0.01	4	2.75	0.01	3
Post 5 ** ^v	0.3	4.91	0.14	3	4.59	0.08	3
VMP 3	0.4	3.10	0.01	2	2.66	0.05	3
VMP 1	0.4	2.93	0.01	2	2.51	0.05	3
VMP 2	0.4	1.60	0.02	2	1.21	0.13	3

3.4.2. Modell nach Schuck und Dolivet

Abbildung 8 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss Modell von Schuck und Dolivet [Schuck, Dolivet, 2002]. Das Proteinpulver weist eine CR von 80% auf. Die Magermilchpulver Nr. 1 bis Nr. 6 weisen negative oder leicht positive Werte auf. Die Kalibrationsmuster MMP 25 bis MMP 100 liegen auf einer Geraden und weisen

Kristallisationsraten von 8% bis 38% auf. Das Magermilchpulver Nr. 7 und das Permeatpulver haben eine CR von 77%, das Laktosepulver eine CR von 85% und die postkristallisierten Pulver weisen CR von 53%, 9% und eine negativen Wert auf.

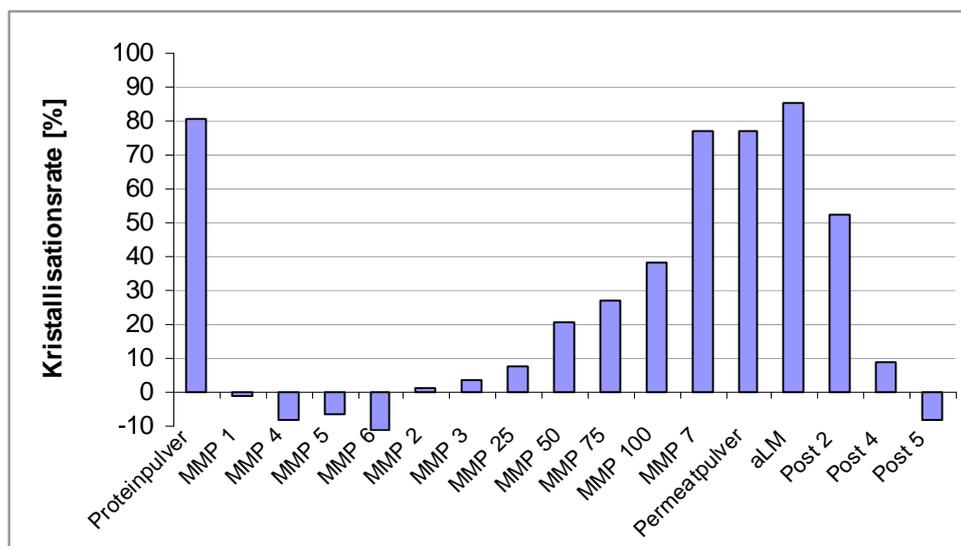


Abbildung 8: Kristallisationsraten der Proben berechnet gemäss Modell von Schuck und Dolivet

3.4.3. Modell nach Roetman

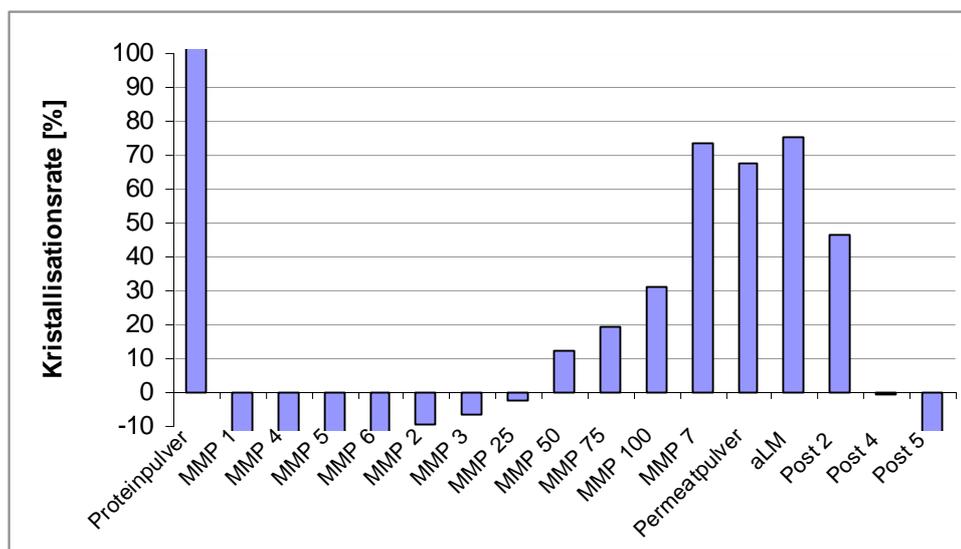


Abbildung 9: Kristallisationsraten der Proben berechnet gemäss Modell von Roetman

Abbildung 9 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss Modell von Roetman [Roetman, 1982]. Das Proteinpulver weist eine CR von 223% auf. Die Magermilchpulver Nr. 1 bis Nr. 6 sowie die Probe MMP 25 weisen negative Werte auf. Die Kalibrationsmuster MMP 50 bis MMP 100 liegen auf einer Geraden und weisen Kristallisationsraten von 12% bis 31% auf. Das Magermilchpulver Nr. 7, das Permeatpulver sowie die Laktose haben eine CR in der Region von 70%. Die postkristallisierten Pulver weisen CR von 47% respektive zwei negative Werte auf.

3.4.4. Anpassung eines neuen Modells

Abbildung 10 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss einem neuen Modell mit Blindwertkorrektur. Das Proteinpulver weist eine CR von 324% auf. Die Magermilchpulver Nr. 1, 4, 5 und 6 weisen CR von beinahe Null respektive negative Werte auf. MMP 2 und MMP 3 haben eine CR von rund 5%. Die Kalibrationsmuster MMP 25 bis MMP 100 liegen auf einer Geraden und weisen Kristallisationsraten von 11%, 24%, 31% und 42% auf. Das Magermilchpulver Nr. 7 hat eine CR von 80%, das Permeatpulver eine CR von 70% und die Laktose eine CR von 77%. Die postkristallisierten Pulver weisen CR von 56%, 12% und einen negativen Wert auf.

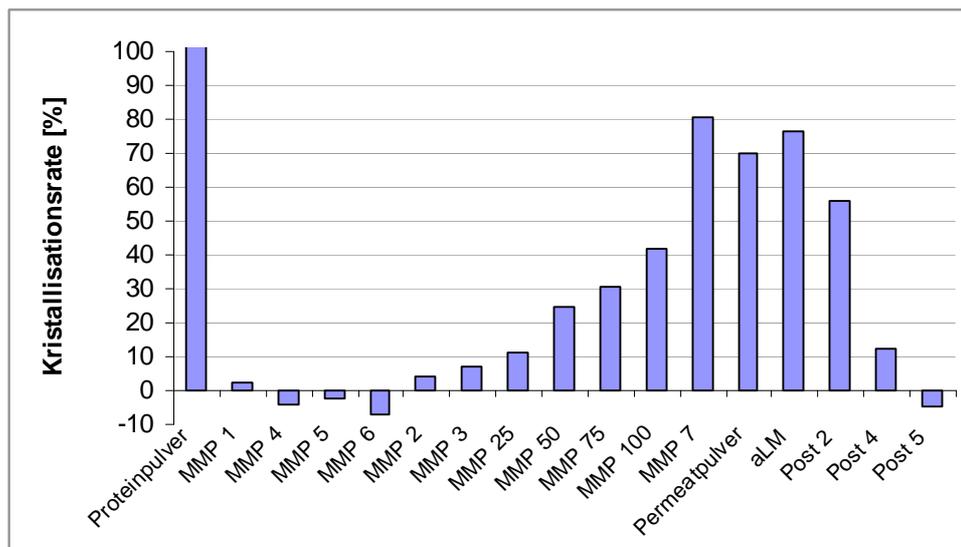


Abbildung 10: Kristallisationsraten berechnet mit einer Blindwertkorrektur für Magermilchpulver

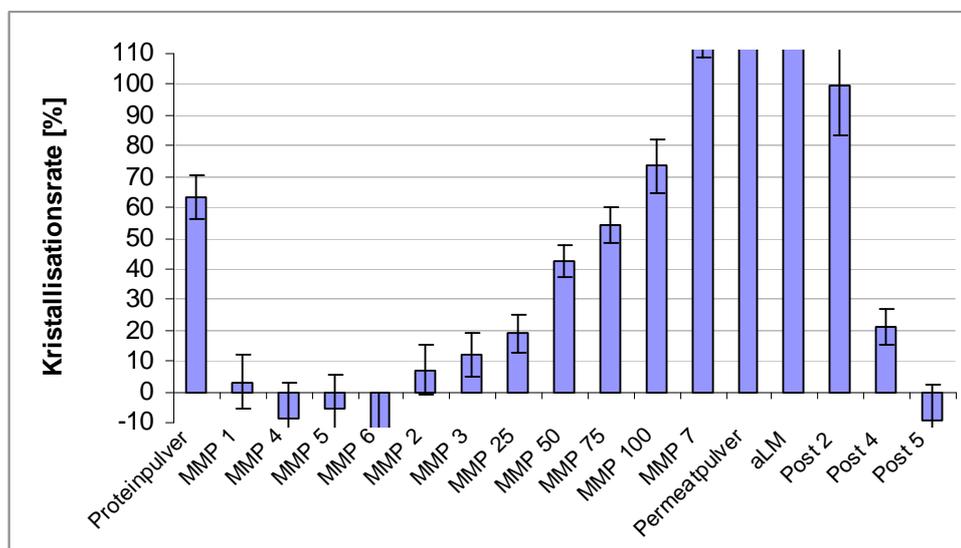


Abbildung 11: Kristallisationsraten mit Vertrauensintervall ($\alpha=5\%$) berechnet gemäss Modell mit linearer Regression für Magermilchpulver

Abbildung 11 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss einem neuen Modell, welches mit linearer Regression hergeleitet worden ist. Das Proteinpulver weist eine CR von 63% auf. Die Magermilchpulver Nr. 1, 4, 5 und 6 weisen CR von beinahe Null respektive negative Werte auf. MMP 2 hat eine CR von 7%, MMP 3 von 12% und MMP 25 von 19%. Die Kalibrationsmuster MMP 50 bis MMP 100 liegen auf einer Geraden und weisen

Kristallisationsraten von 43%, 54% und 74% auf. Das Magermilchpulver Nr. 7, das Permeatpulver und die Laktose weisen CR von 150% bis 250% auf. Die postkristallisierten Pulver weisen CR von 100%, 21% und einen negativen Wert auf.

3.4.5. Ausarbeitung einer neuen Analysemethode

Wegen der schlechteren Laborpräzision der Trockenschrankmethode suchte man eine alternative Methode zur Bestimmung des Kristallisationsgrades. Die Idee war es, mittels KF-Titration von Pulver, welches eine bestimmte Wasseraktivität aufweist, zu reproduzierbaren Resultaten zu kommen, die amorphe und kristalline Pulver deutlich unterscheidet. Diese Werte lassen sich dann mittels geeigneter Methode in ein mathematisches Modell umwandeln. Die erhofften Vorteile sind die Ausschaltung von Matrix-Effekten, die Eliminierung des Einflusses durch schwankende Luftfeuchtigkeit und eine Verminderung der Resultateunsicherheit gegenüber der KF-TS-Methode.

Die Resultate der Wasserbestimmung der isohumiden Proben sind in Tabelle 13 zusammengestellt. Der Wassergehalt von Laktose beträgt 5.1%. Bei den Milchpulvern weisen jene mit einem höheren Kristallisationsgrad (CR) höhere Wassergehalte auf als solche mit amorpher Struktur. Die Differenz zwischen solchen Proben beträgt 1.1% bis 1.5%.

Tabelle 13: Wassergehalt (TW) [g/100g] von isohumiden Proben gemäss KF-Titration; s Standardabweichung [g/100g], N Anzahl Bestimmungen

Probe	TW	s	N	Probe	TW	s	N
MMP 1	4.7	0.03	2	MMP 3	4.3	0.07	3
MMP 4	4.6	0.012	2	MMP 7	6.1	0.02	2
MMP 5	4.6	0.03	2	Post 2	6.0	0.02	2
MMP 6	4.6	0.05	2	Post 4	4.0	-	1
MMP 25	4.8	0.03	3	Post 5	4.1	-	1
MMP 50	5.1	0.01	2	αLM	5.1	0.05	2
MMP 75	5.4	0.03	4	Proteinpulver	7.1	0.04	2
MMP 100	5.8	0.05	2	VMP 2	3.1	-	1

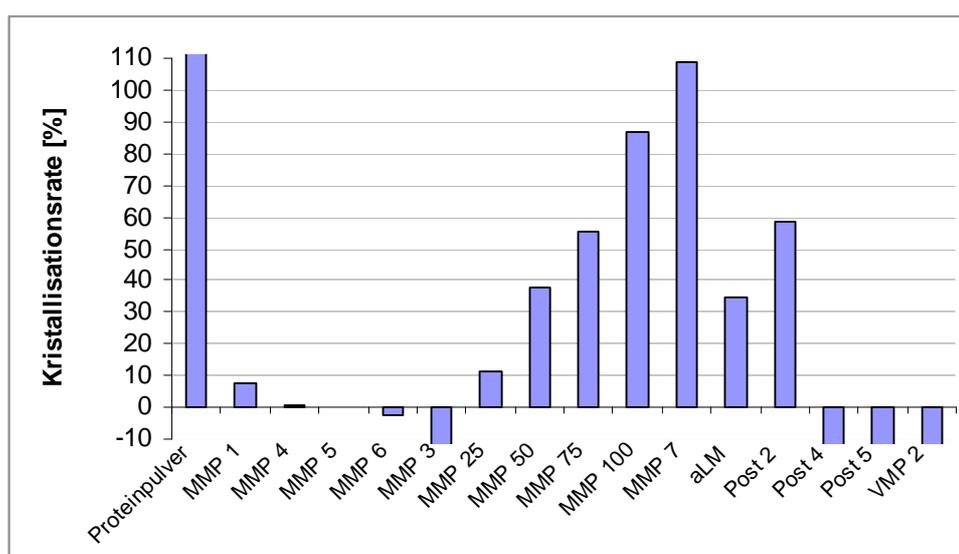


Abbildung 12: Kristallisationsraten berechnet gemäss Modell mit Blindwertkorrektur und Berechnungsfaktor anhand der Messwerte der KF-Titration von isohumiden Proben

Abbildung 12 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss einer neuen Bestimmungsart mit Blindwertkorrektur. Das Proteinpulver weist eine CR von 784% auf. MMP 1 hat eine CR von 8%. Die Magermilchpulver Nr. 4, 5, 6 und 3 weisen CR von beinahe Null respektive negative Werte auf. Die Kalibrationsmuster MMP 25 bis MMP 100 und MMP 7 liegen auf einer Geraden und weisen Kristallisationsraten von 12%, 38%, 55%, 87% und 109% auf. Die Laktose weist eine CR von 35% auf. Die postkristallisierten Pulver weisen CR von 58% und zwei negative Werte auf. Das Vollmilchpulver weist ebenfalls einen negativen CR aus.

Abbildung 13 zeigt die Kristallisationsraten (CR) gemäss einer neuen Bestimmungsart mit Blindwertkorrektur. Das Proteinpulver weist eine CR von 152% auf. MMP 1 hat eine CR von 11%. Die Magermilchpulver Nr. 4, 5, 6 weisen CR von 5%, 5% und 3% auf. MMP 3 weist ein negatives Resultat aus. Die Kalibrationsmuster MMP 25 bis MMP 100 und MMP 7 liegen auf einer Geraden und weisen Kristallisationsraten von 15%, 37%, 52%, 78% und 97% auf. Die Laktose weist eine CR von 36% auf. Post 2 weist eine CR von 86% auf. Die restlichen Werte sind negativ.

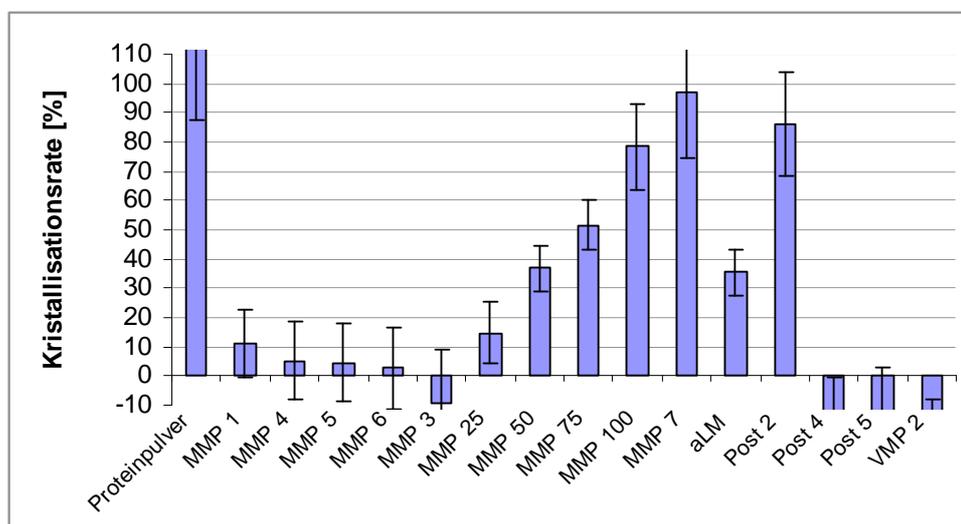


Abbildung 13: Kristallisationsraten mit Vertrauensintervall ($\alpha=5\%$) berechnet gemäss Modell mit linearer Regression anhand der Messwerte der KF-Titration von isohumiden Proben

Die a_w -Werte zeigen eine steigende Tendenz von der Probe MMP 25 bis hin zur Probe MMP 75 (Tabelle 14). Dieser Trend korreliert mit dem Anteil prekristallinem Magermilchpulver in der Mischung. Die Probe MMP 100 wurde in einer anderen Serie äquilibriert.

Tabelle 14: Wasseraktivität von isohumiden Analyseproben vor der KF-Titration

Probe	MMP 25	MMP 50	MMP 75	MMP 100
a_w -Wert	0.22	0.23	0.24	0.23

Auf der Suche nach Merkmalen, welche amorphe und kristalline Pulver unterscheiden wurden auch DSC- und NIR-Analysen durchgeführt, um das Potential der Methoden abschätzen zu können. Auf den NIR-Spektren (Anhang 5) konnten bei Frequenzen von 4800cm^{-1} und 5150cm^{-1} deutliche Unterschiede zwischen kristallinen und amorphen sowie zwischen getrockneten und feuchten Proben festgestellt werden. Bei der DSC-Analyse konnte bei 140°C ein Peak entdeckt werden, welcher nur bei der kristallinen Probe (MMP

7) ausgeprägt zu sehen war (Anhang 6). Bei der amorphen Probe (MMP 1) war nur ein minimaler Ansatz sichtbar.

3.5. Validierung der KF-Methode

3.5.1. Überprüfung der Richtigkeit der KF-Methode

Für das reine Laktosepulver sowie für das unveränderte Magermilchpulver (MMP 1) konnte gezeigt werden, dass bei 30°C mit reinem Methanol alles Wasser innert weniger Minuten extrahiert werden kann. Die Proben brauchen sich dabei nicht vollständig aufzulösen.

Bei der Titration von α -Laktosemonohydrat in Methanol/Formamid bei 50°C steigt der Verbrauch an Titriermittel in den ersten zwei Minuten stark an und verläuft linear. Nach vier Minuten erreicht das Volumen ein Plateau. Danach steigt der Titriermittelverbrauch kaum mehr an (Abbildung 14). Bei der Extraktion in Methanol (40°C) wird bereits nach 3 Minuten der Maximalwert von 5.1% erreicht (Abbildung 15). Bei der Titration in Hydranal Solvent bei 45°C erreicht der titrierte Wassergehalt nach 4.5 Minuten ein Plateau. Dieser stabile Wassergehalt liegt zwischen 5.0% und 5.1% (Abbildung 16).

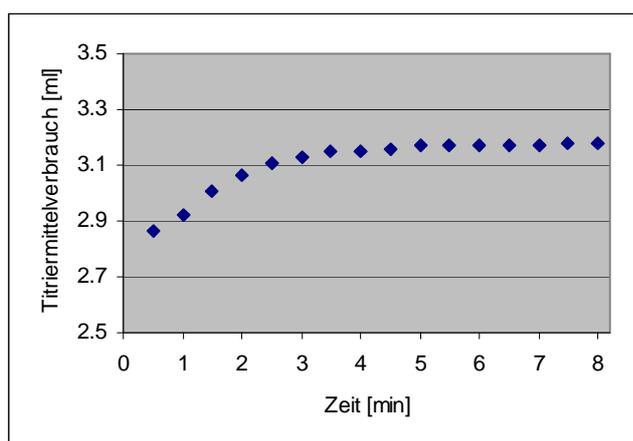


Abbildung 14: KF-Titrationsverlauf von α -Laktosemonohydrat in Methanol/Formamid bei 50°C

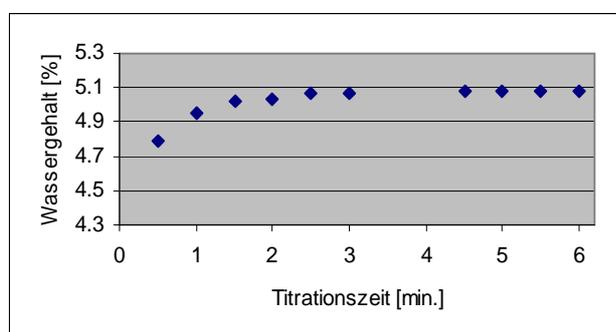


Abbildung 15: KF-Titrationsverlauf von α -Laktosemonohydrat in Methanol bei 40°C

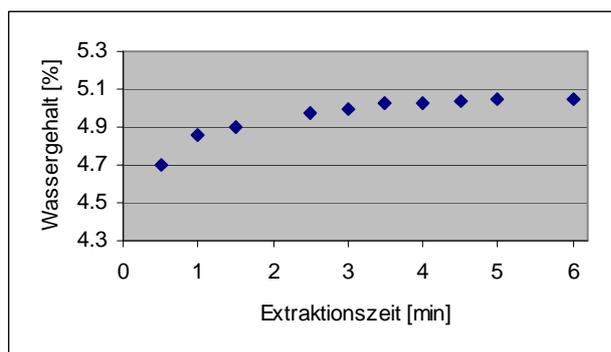


Abbildung 16: KF-Titrationsverlauf von α -Laktosemonohydrat in Hydranal Solvent bei 45°C

Bei der Titration von Magermilchpulver MMP 1 in Methanol/Formamid bei 50°C steigt der Wassergehalt stetig an. Die Steigung schwächt sich nach drei Minuten ab, erreicht jedoch noch kein Plateau (Abbildung 17). Bei der Extraktion in Methanol (50°C) wird bereits nach einer Minute der Maximalwert von 4% erreicht (Abbildung 18). Bei der Titration in Hydranal Solvent bei 50°C erreicht der titrierte Wassergehalt nach einer Minute den Endwert von 4% (Abbildung 19).

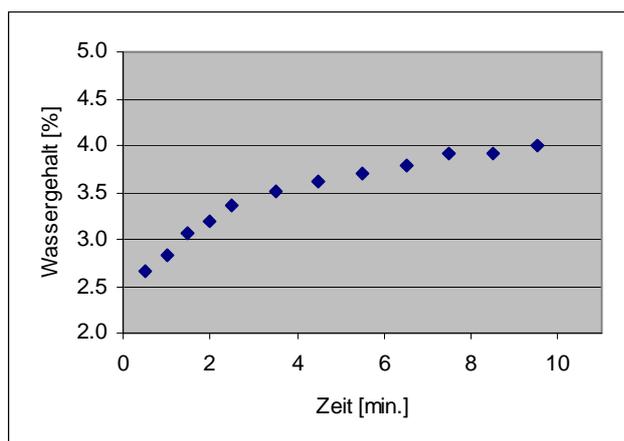


Abbildung 17: KF-Titrationsverlauf von MMP 1 in Methanol/Formamid bei 50°C

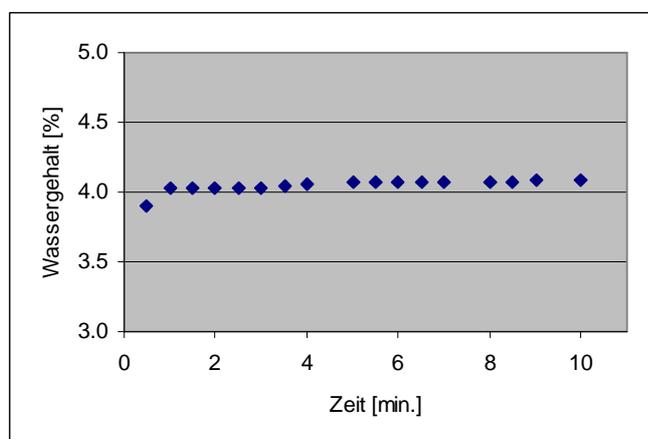


Abbildung 18: KF-Titrationsverlauf von MMP 1 in Methanol bei 50°C

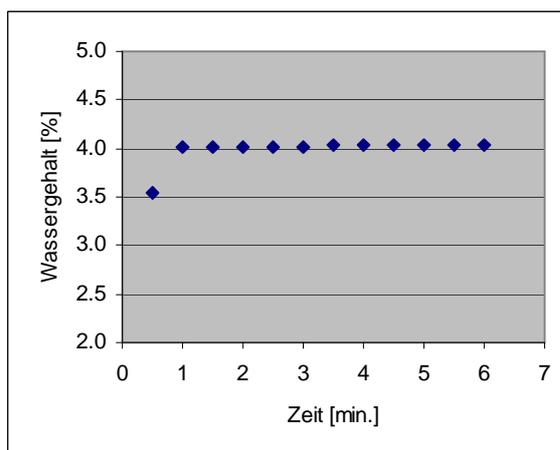


Abbildung 19: KF-Titrationsverlauf von MMP 1 in Hydranal Solvent bei 50°C

Der Massenverlust bei 120°C von α -Laktose-Monohydrat beträgt $5.04\% \pm 0.11\%$ ($\alpha=95\%$; $n=6$). Bei der anschliessenden KF-Titration konnten noch 0.3% Wasser gefunden werden.

Tabelle 15 zeigt die Resultate des Vergleichs von drei Lösungsmitteln für die KF-Titration. Die Resultate der drei Lösungsmittel unterscheiden sich innerhalb der Produkte nicht signifikant. Die Standardabweichung der Versuche mit dem Lösungsmittel Solvent liegen bei keiner der analysierten Probe über dem Durchschnitt aller drei Lösungsmittel.

Tabelle 15: Wassergehalte (TW) der KF-Titration (3 Minuten Extraktionszeit); Werte in g/100g; * Die vollständige Extraktion dauerte bei dieser Probe 10 Minuten

Produkt Lsg-Mittel	MMP S		MMP S I		CR 1		Post 1		Post 3	
	TW	s	TW	s	TW	s	TW	s	TW	s
Solvent	4.01	0.03	4.05	0.02	5.93	0.07	4.43	0.06	4.71	0.05
Met-OH	4.06	0.05	4.10	0.01	5.92	0.05	4.53	0.04	4.75	0.02
Met-OH/Formamid	4.03*	0.04	4.11	0.05	5.93	0.08	-	-	-	-
Gesamthaft	4.03	0.04	4.09	0.03	5.93	0.06	4.48	0.07	4.73	0.04

Für die Auswahl der Methode sind die Geschwindigkeit der Extraktion sowie die Dispergierfähigkeit entscheidend. Magermilchpulver bildet in Met-OH/Formamid Klumpen. Dieses Lösungsmittel kann also nicht empfohlen werden. Das Zweikomponenten-System mit Solvent und Titrant weist rasche Extraktionsgeschwindigkeiten auf, die Extraktion in Met-OH/Formamid verläuft hingegen deutlich langsamer. Für das Gemisch mit kristalliner Laktose verläuft die Extraktion in Met-OH ebenfalls langsamer als in Solvent. Da das Ziel dieser Arbeit die Analyse des Kristallwassers ist, wird die Methode mit Hydranal Solvent als Lösungsmittel sowie Hydranal Titrant als Titrationsmittel gewählt. Die Extraktionszeit muss sechs Minuten betragen, da Pulver mit kristalliner Laktose mehr Zeit für die Extraktion benötigen.

3.5.2. TGA

In Tabelle 16 sind die Resultate der TGA zusammengefasst. Die Hälfte der Proben weist bei 120°C eine Stufe vor. Alle diese Proben beinhalten kristalline Laktose.

Tabelle 16: Resultate der Bestimmung des Massenverlustes mittels TGA

Werte in g/100g	Massenverlust bei Stufen		
	105-135°C	25-135°C	"freies H ₂ O"
Proteinpulver	0.0	8.3	8.3
MMP 1	0.0	5.2	5.2
MMP 6	0.0	5.0	5.0
MMP 50	1.0	6.5	5.5
MMP 75	1.4	6.7	5.3
MMP 100	1.7	8.0	6.4
MMP 7	2.4	7.9	5.5
Post 2	2.9	6.1	3.2
Post 4	0.0	4.2	4.2
Post 5	0.0	5.5	5.5
Permeatpulver	3.6	6.8	3.2
αLM	5.8	7.5	1.7
VMP 1	0.0	4.3	4.3
VMP 2	0.0	2.4	2.4

3.5.3. Wiederhol-, Laborpräzision und Methodenfehler

Tabelle 17: Wiederholpräzision ($s_{\text{Wiederhol}}$), Laborpräzision (s_{Labor}) sowie der Methodenfehler (VK) der Trockenschrank-Methode; N Anzahl Messungen, * Trocknung ausschliesslich im Modell Memmert

Probe	$s_{\text{Wiederhol}}$ [g/100g]	N	s_{Labor} [g/100g]	N	VK [%]
MMP 1	0.04	3	0.16	9	4.8
MMP 3	0.04	7	-	-	-
MMP 25 *	0.03	2	0.05	5	1.3
MMP 50	0.04	3	0.08	6	1.6
MMP 75 *	0.03	3	-	-	-
MMP 75	0.23	3	0.24	6	4.5
MMP 100 *	0.06	3	0.08	6	1.4
MM 7	0.05	4	0.16	7	4.8

Die Wiederholpräzision, die Laborpräzision sowie der Methodenfehler der Trockenschrank-Methode ist in Tabelle 17 für alle analysierten Pulver angegeben.

Die Wiederholpräzision, die Laborpräzision sowie der Methodenfehler der KF-Titrationsmethode ist in Tabelle 18 für alle analysierten Pulver angegeben.

Tabelle 18: Wiederholpräzision ($s_{\text{Wiederhol}}$), Laborpräzision (s_{Labor}) sowie der Methodenfehler (VK) der KF-Titration; N Anzahl Messungen

Probe	$s_{\text{Wiederhol}}$ [g/100g]	N	s_{Labor} [g/100g]	N	VK [%]
MMP 1	0.03	6	0.06	13	1.4
MMP 2	0.004	2	-	-	-
MMP 3	0.01	4	0.06	7	1.4
MMP 4	0.01	2	-	-	-
MMP 5	0.03	2	-	-	-
MMP 6	0.04	2	-	-	-
MMP 7	0.04	6	0.05	13	0.8
MMP 25	0.02	3	0.03	4	0.6
MMP 50	0.01	3	-	-	-
MMP 75	0.01	3	0.01	4	0.2
MMP 100	0.02	3	0.05	7	0.7
Post 2	0.10	3	0.15	4	2.9
Post 5	0.12	2	0.16	3	3.3
aLM	0.01	2	0.03	4	0.6
Proteinpulver	0.08	4	0.08	5	1.2
Permeatpulver	0.04	9	0.05	18	1.0
VMP 1	0.01	2	-	-	-

Die Wiederholpräzision, die Laborpräzision sowie der Methodenfehler der neuen aw-Methode ist in Tabelle 19 für alle analysierten Pulver angegeben.

Tabelle 19: Wiederholpräzision ($s_{\text{Wiederhol}}$), Laborpräzision (s_{Labor}) sowie der Methodenfehler (VK) der neuen aw-Methode; N Anzahl Messungen

Probe	$s_{\text{Wiederhol}}$ [g/100g]	N	s_{Labor} [g/100g]	N	VK [%]
MMP 1	0.04	3	0.03	8	0.8
MMP 6	0.05	3	-	-	-
MMP 7	0.03	3	0.09	7	1.6
MMP 25	0.04	3	0.09	6	2.0
MMP 50	0.03	2	0.08	4	1.7
MMP 75	0.03	4	-	-	-
Post 2	0.02	2	-	-	-

3.5.4. *Mikroskopie*

Die Schätzwerte der Kristallisationsraten sind in Tabelle 6 dargestellt.

3.5.5. *Resultateunsicherheit*

Um die zu erwartende Genauigkeit der Methoden abschätzen zu können, werden die Fehler der Einzelschritte addiert und in Bezug zum Wassergehalt von Magermilchpulver gesetzt. Anhang 8 zeigt die Berechnung der Fehlerfortpflanzung für die angestrebte

Methode für die Analyse von Magermilchpulver mit einem Laktosegehalt von 54%. Der Kristallwassergehalt bezogen auf das Feuchtgewicht des Pulvers variiert zwischen 0% (Kristallisationsgrad von 0%) und 2.4% (Kristallisationsgrad von 100%). Im besten Fall bleibt eine Unsicherheit von 5% bezüglich des Kristallisationsgrades von Magermilchpulver, im schlechteren Fall beträgt die Unsicherheit 13%.

3.6. Literatur-Recherche

Die Suche gemäss Schneeballsystem über Zitierungen wurde in dieser Arbeit am meisten praktiziert. Sie führte zu zahlreichen neuen hilfreichen Beiträgen.

In Tabelle 20 sind die Wortlaute der Suchabfragen in den Datenbanken sowie die jeweilige Anzahl Treffer zusammengestellt. Die Kombination von den Begriffen „milk powder“ und „water“ führt zu mehreren Hundert Ergebnissen. Durch das Hinzufügen eines dritten Begriffes kann die Anzahl Ergebnisse um den Faktor zehn reduziert werden. Spezielle Begriffe wie „amorphous lactose“, „sorption“ oder „dynamic vapour sorption“ führen zu einer überschaubaren Anzahl und zu hilfreichen Beiträgen. Insgesamt wurden weniger neue Artikel über die Datenbanken gefunden als in der Semesterarbeit. Sie waren meist jüngeren Publikationsdatums oder dienten der Erschliessung einer neu aufgetauchten Fragestellung.

Tabelle 20: Syntax der Suchabfragen in der Datenbank Web of Science [c] mit der Anzahl Ergebnissen.

Syntax der Abfrage (Suchbereich)	Anzahl Ergebnisse
TS="milk powder" and TS="water" (DocType=All document types)	304
TS="milk powder" and TS="water" and TS="interaction" (DocType=All document types)	11
TS="milk powder" and TS="water" and TS="energy" (DocType=All document types)	16
TS="milk powder" and TS="water of crystallization" (DocType=All document types)	1
TS="milk powder" and TS="water" and TS="lactose" (DocType=All document types)	43
TS="milk powder" and TS="water" and TS="water activity" (DocType=All document types)	38
TS="milk powder" and TS="water" and TS="oven" (DocType=All document types)	8
TS="milk powder" and TS="water" and TS="karl fischer" (DocType=All document types)	5
TS="milk powder" and TS="water" and TS=state (DocType=All document types)	21
TS="surface composition" and TS=crystallization (DocType=All document types)	46
TS="amorphous lactose" and TS="water" (DocType=All document types)	85
TS="amorphous lactose" and TS="milk powder" (DocType=All document types)	25
TS="amorphous lactose" and TS="determination" (DocType=All document types)	12
TS="sorption" and TS="milk powder" (DocType=All document types)	34
TS="dynamic vapour sorption" (DocType=All document types)	23
TS="dynamic vapour sorption" and TS=milk (DocType=All document types)	2

4 Diskussion

4.1. Statistische Auswertung

Für kleine Stichproben ($n < 12$) besitzt ein Anpassungstest nicht dieselbe Aussagekraft wie für grössere Stichproben [Looser, 2003]. Bei chemisch-physikalischen Analysemethoden wird davon ausgegangen, dass die Resultate normal verteilt sind. In den Methoden wird die Wiederholgrenze deshalb auch gemäss der Wahrscheinlichkeit einer Gauss-Verteilung angegeben.

4.2. Optimierung der KF-Titration

Die Diskussion der einzelnen Verbesserungsschritte wird kurz gehalten, da über die Validierung eine umfassendere Beurteilung der Methode erfolgt.

Es kam wiederholt zu materialbedingten Unterbrüchen. Eine Schwachstelle der Titrationseinheit ist die Schlauchverbindungsstelle oberhalb des Dosierkolbens. Wird das Gewinde zu stark angezogen, so krümmt sich die Dichtungslasche und beim Auffüllen des Kolbens wird Luft angezogen. Die Luft steigt danach in die Titrierschläuche und kann so zu falschen (zu hohen) Resultaten führen. Auch die Dosierkolben sind anfällig auf Undichtheiten und müssen gemäss Hersteller regelmässig gewartet werden.

4.2.1. Löslichkeit von α -Laktose-Monohydrat

Die Löslichkeit von α -Laktosemonohydrat ist stark von der Temperatur abhängig. Diese Resultate bestätigen Hinweise aus der Literatur [Johnson, Conforti, 2003]. Da die Überprüfung auf vollständige Extraktion des Wassers positiv ausgefallen ist, kann gesagt werden, dass die Löslichkeit der Laktose mit den in dieser Arbeit gewählten Probemengen kein limitierender Faktor für die KF-Titration ist.

4.2.2. Drift

Gemäss Scholz beträgt die Drift mindestens 0.02 bis 0.05 ml pro Stunde, diese Werte würden jedoch in der Praxis kaum erreicht [Scholz, 1984]. Gemäss dem Gerätehersteller beträgt die übliche Drift wenige Mikroliter pro Minute. Die erhaltenen Werte liegen im oberen Bereich der Werte von Scholz. Die Maximalwerte sind bis zu drei Mal grösser als seine Angaben. Sie stimmen jedoch gut mit den Anforderungen des Geräteherstellers überein und sind somit akzeptabel, da auch die Präzision und der Methodenfehler befriedigende Werte aufweisen.

4.2.3. Einwaage

Die Verbesserungen führten zu befriedigenden Resultaten. Der Einsatz eines Glasschiffs könnte den Probezugabeprozess noch verbessern. Gemäss Angaben des Lieferanten gibt es zurzeit kein solches Modell auf dem Markt. Falls die KF-Titration als Routinemethode installiert werden sollte, so könnte es sich lohnen, einen Glasbläser mit einer Spezialanfertigung zu beauftragen.

4.2.4. Faktorbestimmung

Obwohl die Resultate den Anforderungen genügen, kann die Standardabweichung der Faktorbestimmung noch verbessert werden. Die Temperatur-Entwicklung in der Zelle ist

möglicherweise Ursache für zu tiefe Werte der Zweitbestimmung. Die Titerbestimmung ist stark abhängig von der ausführenden Person. Ein geübter Laborant wird dabei noch zu besseren Resultaten kommen. Es wird auch von einer Abhängigkeit von der Methanolmenge berichtet. Bei geringerer Methanolmenge oder einer höheren Wasserkonzentration führe dies zu höheren Faktoren [Scholz, 1984]. Der Vergleich mit dem Referenzstandard-Reagens ist nicht zulässig, da dieses für eine Titrations-Temperatur von 20°C ausgelegt ist. Eine temperaturunabhängige Alternative wäre eine feste Urtiter-Substanz wie Natriumtartrat-2-hydrat. Falls mit Wasser gearbeitet wird, so muss die Spritze vor der Bestimmung drei Mal gespült werden [Scholz, 1984]. Eine Methode wie der KF-Ofen würde dank der Möglichkeit der tiefen Titrationstemperatur die Titerbestimmung robuster machen.

4.3. Optimierung der Trockenschrank-Methode

4.3.1. Zusatz von Quarzsand

Die Reproduzierbarkeit und die gute Wiederholbarkeit sind bei dieser Methode wichtiger als „richtige“ Resultate, da eine systematische Abweichung immer korrigiert werden kann. Die Trockenschrank-Methoden liefern keine richtigen Resultate, da sich damit weder alles Wasser erfassen lässt, noch lässt sich damit nur das „freie“ Wasser bestimmen [Rückold, Grobecker, Isengard, 2000]. Da der Sand die Wiederholbarkeit negativ zu beeinflussen scheint, ist es richtig, auf den Zusatz zu verzichten.

4.3.2. Reihenfolge des Wägens

Die Resultate bestätigen, dass die Methode gut geeignet und das Material in Ordnung ist und dass sorgfältig gearbeitet wird.

4.3.3. Temperaturschwankungen des Trockenschranks

Die gängigen Methoden fordern Temperaturschwankungen von maximal 2°C. Ein Schrank mit einer Variation von 5°C eignet sich nicht für präzise und reproduzierbare Analysen. Für eine abschliessende Beurteilung dieser Frage müssen noch mehr Versuche im Memmert-Trockenschrank durchgeführt werden. Es muss auch in Betracht gezogen werden, dass unterschiedliche Standardabweichungen auf die Unterschiede des Probematerials zurück zu führen sind. Postkristalline Pulver mit einer kompakten Struktur geben das Wasser nicht mit derselben Regelmässigkeit ab wie die unveränderten Pulver. Auch die Partikelgrösse beeinflusst gemäss Mathlouthi die Resultate der Trocknungsmethoden, und zwar jene unter Vakuum und jene bei Atmosphärendruck [Mathlouthi, 2001].

4.3.4. Einwägen der Tara

Die Probleme könnten behoben werden. Ein separates Wägen von Deckel und Gefäss scheint keine gute Alternative zu sein. Die Summe würde zu gross, da durch den Unterdruck der geschlossenen Gefässe weniger Luft mitgewogen wird als bei der Arbeit unter Atmosphärendruck. Man könnte entgegen, dass diese Masse der Luft verschwindend klein sei, doch viele kleine Fehler summieren sich zu einem grösseren Fehler.

4.4. Bestimmung des Gehalts an α -Laktosemonohydrat

4.4.1. *Bestimmung des stark gebundenen Wassers*

Dank der Trennung der KF-Titration von der Bestimmung des Massenverlustes konnten die Probleme, welche die Hygroskopizität der getrockneten Pulver in vorangehenden Arbeiten verursacht hatten, eliminiert werden [Hurrell, 2005]. Hurrell trocknete die Proben vor der KF-Titration und hatte Probleme mit der Wiederholbarkeit. Im Falle einer Wasseraufnahme führte dies zu hohen Ergebnissen bei der Restwasser-Bestimmung (Kristallwasser) mittels KF-Titration. In der nun praktizierten Methode führt eine allfällige Wasseraufnahme nicht zu falsch positiven Ergebnissen wie bei Hurrell, sondern zu kleinen Kristallisationsraten, da das „freie“ Wasser (Trockenschrank) vom Gesamtwasser (KF-Titration) subtrahiert wird.

Die Standardabweichung der KF-Titration liegt von wenigen Ausnahmen abgesehen innerhalb der geforderten 0.05g/100g. Bei den Ausnahmen handelt es sich um das Proteinpulver und um postkristallisierte Proben. Das Proteinpulver ist möglicherweise stärker hygroskopisch als die anderen Proben. Die postkristallisierten Proben zeigten kein gutes Auflösungsverhalten. Die Extraktionskurven zeigten, dass die Wasserfreigabe bei diesen Proben langsamer ist, was zu mehr Variabilität führen kann. Diese Proben sind allerdings nicht repräsentativ für marktübliche Milchpulver. Die Probe MMP 3 wurde nur 3 Minuten lang titriert, was möglicherweise zu einer höheren Standardabweichung führte. Im Verlaufe der Arbeit zeigte sich, dass zur vollständigen Freisetzung des Wassers sechs Minuten notwendig sind und drei Minuten nicht bei allen Pulvern ausreichen.

Für die Standardabweichung der Trockenschrank-Methode konsultiere man Abschnitt 4.3.3 weiter oben.

α -Laktose-Monohydrat weist freies Wasser von 0.6% auf. Kling hat vergleichbare Massenverluste von 0.66% im Trockenschrank und bis zu 1.08% im Trockenofen (unter trockenem Luftstrom) analysiert. Ein sechsständiger Versuch bei 102°C hatte einen Massenverlust von 3.17% zur Folge. Beim längeren Versuch war dafür die Standardabweichung kleiner [Kling, 2004]. Andere Trockenmethoden sind nicht besser: Die Semesterarbeit hat gezeigt, dass Laktose auch bei tieferen Temperaturen im Vakuum-Trockenschrank bis zu einem Prozent Masse verliert [Glanzmann, 2007]. Ausserdem geht es hier um die Entwicklung einer empirischen Methode, welche in der Praxis umzusetzen ist, und nicht um die Entwicklung einer Referenzmethode.

4.4.2. *Modell nach Schuck und Dolivet*

Die erhaltenen Werte sind zu tief. Es müsste eher erwartet werden, dass die Werte zu hoch sind, da in dieser Arbeit nur bei 87°C getrocknet wurde anstatt bei 102°C. Die Kalibrationsgerade ergibt immerhin eine lineare Funktion und die verschiedenen Gehaltsstufen lassen sich unterscheiden. Da der Wert für die Laktose nicht so falsch ist, muss angenommen werden, dass die Korrekturfaktoren in diesem Modell nicht universell anwendbar sind. Das Modell von Schuck und Dolivet baut ausserdem auf einer Kalibration auf, welche durch Aufstockung von hydrolisiertem Milchpulver mit α -Laktose-Monohydrat erstellt worden ist. Dabei ist davon auszugehen, dass auch die Hydrolyseprodukte Wasser binden, und nicht nur Proteine und Salze. Das Modell berücksichtigt diese Tatsache jedoch nicht. Im Weiteren entspricht die physikalische Struktur der Kalibrationsmuster nicht der Realität von sprühgetrockneten Milchen. Das Verhalten von gesprühten Laktose/Protein-Gemischen ist anders als das Verhalten einer Trockenmischung von Laktose und Proteinen. MMP 7 ist zum Beispiel eine Mischung von Permeat- und

Proteinpulver mit der chemischen Zusammensetzung eines Standard-Milchpulvers (z.B. MMP 100). Obwohl der Kristallisationsgrad der beiden Proben fast identisch ist, weisen sie unterschiedliche Resultate auf. Dies ist wahrscheinlich auf die Struktur zurück zu führen. Falls Komponenten vor dem Trocknungsprozess gemischt werden, so adsorbieren Proteine Wasser kompetitiv zu anderen Inhaltsstoffen und die kritische Wasseraktivität für die Kristallisation wird beispielsweise verändert. Falls die Komponenten trocken gemischt werden, kommt es möglicherweise auch wegen der grösseren Distanz zwischen Partikeln zu keinen direkten Interaktionen und die obengenannte Verschiebung der kritischen Wasseraktivität wird nicht beobachtet [Nasirpour et al., 2006]. Roetman war der Meinung, dass auch für die Laktose ein Korrekturfaktor in der Berechnungsformel notwendig sei [Roetman, 1982].

4.4.3. Modell nach Roetman

Auch hier fallen die Resultate zu tief aus. Die unterschiedlichen Gehalte sind auch mit diesem Modell unterscheidbar, jedoch stimmt die Richtigkeit noch nicht. Auch diese Korrekturfaktoren scheinen nicht universell anwendbar zu sein. Dass das auf Magermilchpulver zugeschnittene Modell nicht für Proteinpulver funktioniert, war zu erwarten. Dass sich die Kalibrationsgerade in den Minus-Bereich fortsetzt, deutet darauf hin, dass die Korrekturen zu hoch ausfielen. Roetman hat für die Bestimmung der Korrekturfaktoren Kasein und Molkeproteine in gefriergetrockneter Form analysiert. Dies führt erwartungsgemäss zu anderen Resultaten, als wenn sprühgetrocknete Proben verwendet werden [Haque, Roos, 2004].

4.4.4. Anpassung eines neuen Modells

Auch mit dem neuen Modell mit einer Korrektur für den Blindwert der Magermilchpulver erhält man zu tiefe Werte für die Kalibrationsmuster. Der Blindwert weist eine grosse Standardabweichung auf und ist deshalb nicht so gut. Möglicherweise sind nicht alle im Blindwert enthaltenen Muster repräsentativ für „normale“ Magermilchpulver.

Das Modell, das mittels linearer Regression berechnet wurde, scheint für Magermilchpulver gute Werte zu liefern. Die Muster MMP 1 und MMP 25 lassen sich mit dem Modell signifikativ unterscheiden. MMP 25 ist signifikativ tiefer als MMP 50 und MMP 75, welche sich nur ganz knapp signifikativ unterscheiden. MMP 100 ist sehr deutlich als Kalibrations-Probe mit dem höchsten Kristallisationsgrad (CR) zu erkennen. Die Probe Post 2 hat gemäss diesem Modell einen CR von 100%, wobei der Vertrauensbereich $\pm 16\%$ beträgt. Mit diesem Modell scheint es also möglich zu sein, fünf bis sechs CR zwischen 0% und 100% zu unterscheiden. Der Anwendungsbereich ist allerdings auf Magermilchpulver eingeschränkt.

Für Spezialpulver ist das Modell nicht geeignet, diese weisen deutlich zu hohe Werte auf. Deshalb ist auch das Ergebnis für die Mischprobe MMP 7 zu hoch. Obwohl die postkristallisierten Pulver nicht unbedingt den marktüblichen Magermilchen entsprechen, liegen die Resultate im Erwartungsbereich. Auf den ersten Blick erstaunt es, dass für Post 5 ein tieferer Kristallisationsgrad berechnet wird als für Post 4. Post 5 zeigt unter dem Mikroskop nämlich mehr kristalline Strukturen als Post 4 und somit liegt der geschätzte Erwartungswert für diese Probe auch höher.

Es gibt zwei mögliche Gründe: Die Schätzung des Kristallisationsgrades ist falsch oder bei den Kristallen handelt es sich nicht ausschliesslich um α -Laktose-Monohydrat. Die Licht-Mikroskopie kann zu falschen Schätzungen führen, da nur zwei Dimensionen sichtbar sind. So kann ein Partikel rundum kristalline Strukturen aufweisen, ohne dass diese Kristallisation bis in die Tiefe reicht [Vuataz, 1988]. Die Bedingungen für die

durchgeführten Postkristallisationen unterschieden sich. Unterschiedliche Bedingungen führen quantitativ und qualitativ zu unterschiedlichen Ergebnissen. Es ist möglich, dass bei gewissen Kristallisationsbedingungen nicht nur α -Laktose-Monohydrat auskristallisiert, sondern auch eine anhydre Mischform von α - und β -Laktose. Bei 24°C und 57% RH entstehe ein Gemisch im Verhältnis 5:3 (α/β , molekular), bei 85% RH ändere sich jedoch das Verhältnis zu 4:1 [Thomas et al., 2004]. Möglicherweise enthält Post 5 mehr anhydre Kristallformen als die anderen postkristallisierten Pulver.

Gewisse Proben wurden diesen Sommer mittels DVS analysiert, um den Anteil amorpher Laktose zu bestimmen. Für MMP 4, 5 sowie das Permeatpulver liegen die Werte in unserem Erwartungsbereich, für die Proben MMP 6, VMP 1 und 2 existieren erhebliche Abweichungen. Es fällt auf, dass die angewendete DVS-Methode gefriergetrocknete Laktose als Referenz misst. Daher unterscheidet sich die Referenz nicht nur von der Zusammensetzung, sondern auch von der Struktur her erheblich von den Analyseproben.

4.4.5. **Ausarbeitung einer neuen Analysemethode**

Die Resultate der neuen Methode ergeben ein ganz anderes Bild. Laktose gehört auf einmal nicht mehr zu den Proben mit der höchsten CR. Dieser Wert ist sicherlich falsch. Reine Laktosepulver gehören jedoch nicht zum Anwendungsgebiet der neuen Methode, welche sich auf Milchpulver beschränken will. Die Kalibrationsabstufung ist deutlich ersichtlich, MMP 25 lässt sich jedoch nicht klar von MMP 1 unterscheiden. Die Blindwert-Korrektur fällt mit der neuen KF-aw-Methode deutlich besser aus, als bei den anderen getesteten Modellen. Die tendenziell zu tiefen Werte für MMP 25 sind wohl darauf zurückzuführen, dass diese Proben am Analysetag noch nicht vollständig äquilibriert waren (Tabelle 14). Wie auch die vorherigen Modelle muss man beachten, dass diese Methoden nur die wasserhaltige Kristallform erfassen. Insbesondere bei postkristallisierten Pulvern ist deshalb Vorsicht angebracht.

Das Modell, welches mittels linearer Regression entwickelt wurde, präsentiert sich sehr ähnlich. Für Post 2 wird eine höhere CR berechnet. Dieser Wert bestätigt die Beobachtungen unter dem Mikroskop. Post 2 weist wahrscheinlich als einzige postkristallisierte Probe einen hohen Anteil an α -Laktose-Monohydrat auf, was sich in einem höheren Wassergehalt niederschlägt. Die „amorphen“ Magermilchpulver liegen in der selben Bande des Vertrauensbereichs. Gemäss diesem Modell lassen sich momentan nur drei Klassen unterscheiden: 0%-25% CR, 25%-60% CR und 65% und höhere CR. Die Methode kann jedoch noch optimiert werden und dadurch kann sich auch das Vertrauensintervall verkleinern und es lassen sich mehr Stufen signifikativ unterscheiden.

Die Variationen der Methode sind noch zu gross und müssen noch verbessert werden. Der Schlüssel dazu liegt in der Technik der Herstellung isohumider Proben. Durch Absenken der RH auf 11% mit LiCl könnte zwar verhindert werden, dass Proben mit tiefer Wasseraktivität Wasser aufnehmen müssen, es würde jedoch das Problem der verstärkten Hygroskopizität auftauchen, was bei a_w 0.23 weniger Probleme bereitet. Hingegen könnte durch das Arbeiten bei a_w 0.11 die Differenz zwischen dem Wassergehalt von amorphen und kristallinen Proben vergrössert werden, was zu mehr Spielraum bei der Modellbildung führt. Auf einer grösseren Spannweite lassen sich möglicherweise mehr Abstufungen erzielen als bei einer kleineren Differenz. Gemäss Bronlund und Paterson unterscheidet sich der Wassergehalt von amorpher und kristalliner Laktose bei a_w 0.11 zwischen 2.5% und 4%, wo hingegen die Differenz bei a_w 0.23 nur 0.1% bis 2.5% beträgt [Bronlund, Paterson, 2003]. In dieser Arbeit wurden Unterschiede von 1.1% bis 1.5% gemessen, es ist also noch Potential vorhanden. Den a_w -Wert zu erhöhen macht keinen Sinn, da die Adsorption länger braucht für die Stabilisierung als die Desorption. Ab einem kritischen Wassergehalt beginnt dann auch die spontane

Kristallisation. Die Glasübergangstemperatur von Magermilchpulver liegt bei a_w 0.33 bei 30°C [Bronlund, Paterson, 2003].

4.5. Validierung der KF-Methode

4.5.1. Überprüfung der Richtigkeit

Die Titrationskurven sind ein einfaches und effektives Hilfsmittel zur Beurteilung der Vollständigkeit der Extraktion, falls die geeigneten Lösungsmittel gewählt werden. Die Rekonstitution (Rehydratation und Dispersion) wird von der Struktur und der Matrix beeinflusst: Eine offene, poröse Struktur ist besser, Fett führt zu Verschlechterung der Benetzbarkeit [Coucoulas, 2003].

Obwohl durch die Zerkleinerung mit einem Hochfrequenzhomogenisator die Diffusion beschleunigt werden könnte, sollte diese nur zur Anwendung kommen, falls zu lange Extraktionszeiten (länger als 10 Minuten) oder Probleme mit der Drift bestehen. Diese Methode birgt die Gefahr von zusätzlichem Wassereintrag durch die Luft, falls der Homogenisator nicht an die Apparatur angepasst ist.

Gemäss Scholz verlaufen Zwei-Komponenten-Titrations schneller als jene mit Einkomponenten-Reagenzien [Scholz, 1984]. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Probe in Hydranal Solvent besser löslich ist. Solvent sei zur Verbesserung der Löslichkeit auch mit Zusätzen mischbar. Für fetthaltige Produkte sollte also der Zusatz von Chloroform zu Hydranal Solvent möglich sein. Bei neuartigen Proben empfiehlt es sich, als erstes eine solche Titrations-Kurve aufzuzeichnen. Daraus lässt sich auch eine mögliche Zeitersparnis ableiten.

An Stelle der hier beschriebenen KF-Titration wird heutzutage für Milchtrockenprodukte auch die KF-Ofenmethode angewendet [persönliche Mitteilung von Frau Rey, 2007], [Merck, 2006]. Dabei wird das Wasser mittels thermischer Probenvorbereitung aus der Probe in ein Trägergas extrahiert. Der Wassergehalt des Gases wird mittels coulometrischer oder volumetrischer KF-Titration ohne Einsatz von Lösungsvermittlern bestimmt. Ein Aufheizen der Titrationszelle ist nicht mehr notwendig. Durch die vorgängige Trennung des Wassers aus der Probe können Matrix-Effekte oder Nebenreaktionen während der KF-Titration, wie zum Beispiel durch Ascorbinsäure, ausgeschlossen werden. Diese Methode bringe zudem Zeitersparnis und führe zu streng reproduzierbaren Ergebnissen und einer verbesserten Präzision [Anhang 9].

Schuck und Dolivet schlagen vor, zur Bestimmung des Gesamtwassers in Milchpulver die KF-Titration durch eine Vakuum-Trocknungsmethode über einem Salz zu ersetzen. Sie haben die Korrelation dieser beiden Methoden untersucht und sind zum Schluss gekommen, dass die Übereinstimmung gut ist [Schuck, Dolivet, 2002].

Der Wert von 0.3% Restwasser in der getrockneten Laktose ist einerseits auf Wasseraufnahme bedingt durch die Hygroskopizität zurück zu führen (was innert Minuten bis zu 0.03% ausmachen kann), andererseits auf die Zersetzung der Laktose bei hohen Temperaturen (Vugrinec, 2004). Das KF-Reagens wurde zudem gleich zu Beginn der Titration verbraucht. Daraus lässt sich schliessen, dass es sich dabei nur um „oberflächliches“ Wasser handelt und keine Extraktion von Wasser mehr stattgefunden hat, da der Verbrauch danach während 6 Minuten stabil blieb.

TGA: Massenverlust bis 140°C ist systematisch zu hoch. Ab 100°C sind wie bei den Trockenschrankmethoden Zersetzungsreaktionen und die Bildung von flüchtigen Stoffen zu erwarten.

4.5.2. TGA

Die Rampe 2 zwischen 105°C und 140°C könnte das Kristallwasser beinhalten. Listiohadi hat in dieser Region jedoch einen „unbekannten“ Massenverlust registriert. Das Kristallwasser ortet er erst bei Temperaturen oberhalb 140°C [Listiohadi, 2005c]. Das Gerät wurde für diese Arbeit nicht kalibriert. Eine gewisse Verschiebung könnte also stattgefunden haben. Ausserdem sind die Temperaturen auf den Grafiken nicht immer die realen Temperaturen, sondern theoretische. Auf jeden Fall korreliert das Vorkommen der Rampe 2 mit dem Vorhandensein von α -Laktose-Monohydrat in den Pulvern. Dies wird auch durch die neuen Berechnungsmodelle für die Kristallisationsrate gestützt. Die Proben Post 4 und Post 5 sind gemäss den Berechnungen ohne kristalline Strukturen und die TGA zeigt bei den selben Mustern auch keine Rampe 2. Da die Mikroskopie kristalline Strukturen nachweisen kann, muss es sich bei diesen kristallinen Phasen um anhydre Strukturen handeln.

4.5.3. Wiederhol-, Labor-Präzision und Methodenfehler

Ausser bei den postkristallisierten Proben liegt der Methodenfehler der KF-Titration unterhalb 1.5%. Dieser Maximalwert liegt 50% über dem Wert von 1%, den Isengard angibt [Isengard, 2006]. Auch Kromidas spricht bei Titrationen von 1%, welches erreichbar sei [Kromidas, 2000]. Bei 6 von 11 Proben liegt der Fehler jedoch unter dieser Grenze. Der Wert von 1% scheint erreichbar und die getestete Methode ist schon ganz nah dran.

Bei der Feuchtebestimmung verdoppelt sich der Toleranzwert auf 2%. Diese Werte seien immer auch abhängig von der Apparatur [Kromidas, 2000]. Dies zeigt sich bei der Trockenschrank-Methode deutlich. Bei den Serien, bei welchen ausschliesslich im präziseren Schrank getrocknet wurde, liegt der Methodenfehler unter 2%, bei den anderen zum Teil deutlich darüber. Diese Tendenzen müssen noch mit weiteren Analysen bestätigt werden.

Der Methodenfehler der aw-Methode liegt im Bereich des Trockenschanks. Die Proben, welche noch nicht genügend stabilisiert waren, weisen die höchsten Fehler auf. Es kann also sein, dass sich der Methodenfehler noch verbessert, wenn die richtige Methode für das Äquilibrieren gefunden worden ist. Man ist bei dieser Methode noch nicht an der Grenze des Möglichen angekommen.

4.5.4. Kalibrationsgerade

Für eine robuste Kalibration hatte man nicht genügend Proben zur Hand. Die durchgeführte Kalibration basiert auf sehr ähnlichen Produkten von einem Produzenten. Es braucht nun noch mehr Proben von verschiedenen Produzenten und am Besten solche mit bekanntem Kristallisationsgrad. Als Referenzmethode scheinen die NIR-Spektroskopie oder die XRD vielversprechend zu sein. Es sind allerdings zuerst aufwendige Kalibrationen notwendig, um die Methoden quantitativ anwenden zu können. Methoden, welche auf dem Isomerenverhältnis basieren sind die zweite Wahl. Sie können jedoch mit weniger Aufwand installiert werden. Falls Proben mit unterschiedlicher Zusammensetzung erhältlich sind, könnte man damit auch Gleichungssysteme erstellen und diese auflösen. Um die Korrekturfaktoren zu berechnen, wäre diese Methode vielleicht besser als Isolate zu analysieren, wie es Roetman und Schuck & Dolivet machten.

Gemäss persönlicher Mitteilung von Herrn Wüst (31. Oktober 2007) kann man mit 20 unterschiedlichen Proben eine Kalibration des NIR-Spektrometers versuchen. Für die angestrebte Präzision sollte dies bereits ausreichen, damit man die Resultate vergleichen kann. NIR hätte den Vorteil gegenüber der TGA, dass sie ein anderes Funktionsprinzip aufweist und nicht nur wasserhaltige Kristalle nachweisen kann.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Der Literatur-Überblick zur Bestimmung des Kristallisationsgrads von Laktose in Milchpulver konnte weiter verfeinert werden. Die Methode zur Bestimmung des Anteils kristalliner Laktose in Milchpulver konnte verbessert und für Magermilchpulver getestet werden. Es müssen nun noch viel mehr Analysemuster verschiedenster Herkunft und Zusammensetzung mit den Methoden analysiert werden. Auch die Weiterentwicklung des Verfassers konnte mit Magermilchpulver getestet werden. Allerdings sind Verbesserungen im Ablauf sowie in der Reproduzierbarkeit noch nicht nachgewiesen worden. Die Methode hat Potential zur Weiterentwicklung. Die Messungen sollten mit gut äquilibrierten Proben unterschiedlicher Herkunft und Zusammensetzung wiederholt werden. Zur Verbesserung der Berechnungs-Modelle sind weitere Vergleichsmethoden anzuwenden, um exakte Kalibrationsreihen erstellen zu können. Die getesteten Methoden eignen sich nur für die Analyse von α -Laktose-Monohydrat. Besteht die kristalline Phase teilweise oder ganz aus anhydren Kristallen, so liefern die „Wasser“-Methoden falsche Ergebnisse.

Die Robustheit der Methoden muss mittels Versuchen in anderen Labors überprüft werden. Die Reproduzierbarkeit der thermischen Analysen (DSC und TGA) sollte noch getestet werden. Diese Methoden könnten als Referenzmethoden noch weiter optimiert werden. Sobald zwanzig verschiedene Muster vorliegen, kann man mit dem NIR-Spektrometer eine Minimalkalibrierung vornehmen und die Resultate mit den beiden KF-Methoden vergleichen. Das Vertrauensintervall einer Minimalkalibrierung könnte im Bereich der getesteten Methoden liegen.

Ein anderer Ansatz wäre die Ankopplung der Methode an den Herstellprozess (Prekristallisation). Falls die Kristallisationsrate im Konzentrat bestimmt werden kann, wäre es so eventuell möglich, Referenzmuster mit bekanntem Kristallisationsgrad herzustellen. Der Beweis, dass der Kristallisationsgrad des Pulvers gleich gross ist wie im Konzentrat, müsste noch erbracht werden.

6 Literatur

6.1. Werke und Zeitschriften

Augustin M. A., Clarke P. T., Craven H., Powdered Milk / Characteristic of Milk Powders, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, academic press, Oxford (2003), 4705-4710

Baechler R. et al., Milk Powder, International Application published under the patent cooperation treaty, Nr. WO 2006/072438 A2 (2006)

Beckett S.T., The Science of Chocolate, The Royal Society of Chemistry, Cambridge (2000), 1-84

Berlin E., Anderson B.A., Pallansch M.J., Water Vapor Sorption Properties of Various Dried Milks and Wheys, Journal of Dairy Science 51 (1968a), 1339-1344

Berlin E., Anderson B.A., Pallansch M.J., Comparison of Water Vapor Sorption by Milk Powder Components, Journal of Dairy Science 51 (1968b), 1912-1915

Berlin E., Kliman P.G., Pallansch M.J., Changes in State of Water in Proteinaceous Systems, Journal of Colloid and Interface Science 34 (1970a), 488-494

Berlin E., Kliman P.G., Pallansch M.J., Calorimetry and Thermogravimetry of Bound Water in Dried Milk and Whey Powders, Journal of Dairy Science 54 (1970b), 300-305

Blanc D., HACCP Leitfaden F34.1 – Version 8_d, Pro Cert Certification Body, Lausanne (2005), 1-48

Bohren H.U., Kuypers T.W., Meister N., A process for the production of a milk powder, UK Patent Application, Nr. 2'183'135A (1987)

Box G.E.P., Hunter J.S., Hunter W.G., Statistics for Experimenters, Second Edition, Wiley & Sons, Hoboken (2005), 1-620

Bronlund J., Paterson T., Moisture sorption isotherms for crystalline, amorphous and predominantly crystalline lactose powders, International Dairy Journal 14 (2004), 247-254

Brito A., Giulietti M., Study of lactose crystallization in water-acetone solutions, Crystal Research and Technology 42 (2007), 583 -588

Coucoulas L., Agglomeration, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, academic press, Oxford (2003), 73-80

De Caro C.A., Aichert A., Walter Ch.M., Efficient, precise and fast water determination by the Karl Fischer titration, Food Control 12 (2001), 431-436

De Knecht R.J., Van den Brink H., Improvement of the Drying Oven Method for the Determination of the Moisture Content of Milk Powder, International Dairy Journal 8 (1998), 733-738

Dincer T.D. et al., Crystallisation of alpha-lactose monohydrate from dimethyl sulfoxide (DMSO) solutions: influence of beta-lactose, Journal of Crystal Growth 205 (1999), 368-374

- Drapier-Beche N., Fanni J., Parmentier M., Physical and Chemical Properties of Molecular Compounds of Lactose, *Journal of Dairy Science* 82, (1999), 2558-2563
- Eisenbrand G., Römpp Lexikon Lebensmittelchemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1995)
- Figura L.O., The physical modification of lactose and its thermoanalytical identification, *Thermochimica Acta* 222 (1993), 187-194
- Figura L.O., Lebensmittelphysik – Physikalische Kenngrößen – Messung und Anwendung, Springer Verlag, Berlin (2004), 1-417
- Gerhartz W., Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, WILEY-VCH, Weinheim (1985)
- Glanzmann, J., Untersuchung des Einflusses der Zusammensetzung sowie der Prozessführung auf die Kristallisation der Laktose in Milchpulver, Semesterarbeit, HES-SO Wallis, Sion (2007)
- Grogg A., Unterlagen zur Vorlesung "Angewandte Statistik", Hochschule Wallis, Sion (2004), 1-42
- Haque K., Roos Y.H., Differences in the physical state and thermal behaviour of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures, *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 7 (2004), 62-73
- Hardy J., Scher J., Banon S., Water activity and hydration of dairy powders, *Lait* 82 (2002), 441-452
- Hartel R.W., Shastry A.V., Sugar Crystallization in Food Products, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1 (1991), 49-112
- Hartel R.W., Crystallization in Foods, Aspen Publishers, Gaithersburg (2001)
- Heinrich C., Thermogravimetrische Untersuchungen zur Wassergehaltsbestimmung von Milchpulver, *Milchwissenschaft* 25 (1970), 387-391
- Hurrell N., Etude de l'influence de la composition et des paramètres de production sur la cristallisation du lactose dans la poudre de lait, travail de diplôme, HEVs (2005), 1-60
- Isengard H.D., Nowotny M., Dispersion as a Preparatory Step for Karl Fischer Titration, *Deutsche Lebensmittelrundschau* 87 (1991), 176-180
- Isengard H.D., Nowotny M., An Extraction to Serve as a Preparation for the Karl Fischer Titration, *Deutsche Lebensmittelrundschau* 88 (1992), 246-251
- Isengard H.-D., Kling R., Reh C.T., Proposal of a new reference method to determine the water content of dried dairy products, *Food Chemistry* 96 (2006), 418-422
- Johnson J.M., Conforti F.D., Lactose, *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, academic press, Oxford (2003), 3472-3476
- Keogh M.K., Murray C.A., O'Kennedy B.T., Effects of ultrafiltration of whole milk on some properties of spray-dried milk powders, *International Dairy Journal* 13 (2003a), 995–1002

- Keogh M.K., Murray C.A., O'Kennedy B.T., Effects of selected properties of Ultrafiltered spray-dried milk powders on some properties of chocolate, *International Dairy Journal* 13 (2003a), 719–726
- King N., The physical structure of dried milk, *Dairy Science Abstracts* 27 (1965), 91-104
- Kling R., Bestimmung des Wassergehaltes in Trockenmilcherzeugnissen – eine kritische Überprüfung der derzeit gültigen ISO-Vorschrift, *Diplomarbeit, Universität Hohenheim* (2004), 1-90
- Korte D., Hansen P., Fligner K., Preparation of calcium-fortified dry milk powder with crystalline lactose, *European Patent Application, Nr. 0'586'016 A1* (1994)
- Kromidas S., *Handbuch Validierung in der Analytik, WILEY-VCH, Weinheim* (2000), 1-499
- Lane R.A., Buckton G., The novel combination of dynamic vapour sorption gravimetric analysis and near infr-red spectroscopy as a hyphenated technique, *International Journal of Pharmaceutics* 207 (2000), 49-56
- Liang B., Hartel R.W., Effects of Milk Powders in Milk Chocolate, *Journal of Dairy Science* 87(2004), 20-31
- Listihadi Y. et al., Properties of lactose and its caking behaviour, *The Australian Journal of Dairy Technology* 60 (2005a), 33-52
- Listihadi Y. et al., Role of amorphous lactose in the caking of α -lactose monohydrate powders, *The Australian Journal of Dairy Technology* 60 (2005b), 19-32
- Listihadi Y. et al., An exploration of the caking of lactose in whey and skim milk powders, *The Australian Journal of Dairy Technology* 60 (2005c), 207-213
- Looser R., *Statistische Messdatenauswertung, Franzis Verlag GmbH, Poing* (2003)
- Lowe E.K., Paterson A.H.J., A Mathematical Model for Lactose Dissolution, Part II. Dissolution Below the Alpha Lactose Solubility Limit, *Journal of Food Engineering* 38 (1998), 15-25
- Mathlouthi M., Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs, *Food Control* 12 (2001), 409-417
- McComb E.A., Formamide as an Extraction Solvent in Karl Fischer Method for Determining Moisture in Lactose and Maltose, *Analytical Chemistry* 29 (1957), 1375-1375
- Merck G., Vergleichende Untersuchungen von Methoden zur Wassergehaltsbestimmung in einigen pulverförmigen Milchprodukten, *Diplomarbeit, Universität Hohenheim* (2006), 1-152
- Miller V., Method for producing anhydrous whole milk powder having full fat recovery for further use, *US Patent, Nr. 5'672'373* (1997)

- Morgan F., Appolonia Nouzille C., Baechler R., Vuataz G., Raemy A., Lactose crystallization and early Maillard reaction in skim milk powder and whey protein concentrates, *Lait* 85 (2005), 315-323
- Nagarajan R., Singh P., Mehrotra R., Direct Determination of Moisture in Powder Milk Using Near Infrared Spectroscopy, *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry* (2006), 1-4
- Nasirpour A., Scher J., Linder M., Desobry S., Modeling of Lactose Crystallization and Color Changes in Model Infant Foods, *Journal of Dairy Science* 89 (2006), 2365-2373
- Nasirpour A., Scher J., Desobry S., Baby Foods: Formulations and Interactions (A Review), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (2006), 665-681
- Nováková H. et al., The production of clusters in milk chocolate, *International Journal of Food Science and Technology* 37 (2002), 485-495
- Pisecky J., Water activity of milk powders, *Milchwissenschaft* 47 (1992), 3-7
- Raghavan S.L. et al., Dissolution kinetics of single crystals of alpha-lactose monohydrate, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (2002), 2166-2174
- Rahman M.S., State diagram of foods: Its potential use in food processing and product stability – Viewpoint, *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006), 129-141
- Reh Ch., Bhat S.N., Berrut St., Determination of water content in powdered milk, *Food Chemistry* 86 (2004), 457-464
- Roetman K., Methods for the quantitative determination of crystalline lactose in milk products, *Neth. Milk Dairy Journal* 36 (1982a), 1-52
- Roetman K., Quantitative Aspects of Crystalline Lactose in Milk Products, *Prüfschrift zum Erlangen der Doktorwürde, Eigenverlag, Leusden* (1982b), 1-42
- Roos P., Leitfaden zur Validierung chemisch-physikalischer Prüfverfahren und zur Abschätzung der Messunsicherheit, *Dokument Nr. 324.dw, Ausgabe Juli 2004, Rev. 00, Schweizerische Akkreditierungsstelle SAS, Bern* (2004), 1-25
- Roos Y.H., Jouppila K., Söderholm E.S., Crystallization of Amorphous Food Components and Polymers, Roos Y.H., Leslie R.B. and Lillford P.J. (ed.), *Water Management in the Design and Distribution of Quality Foods*, Technomic, Lancaster (1999), 429-451
- Roos Y. H., Importance of glass transition and water activity to spray drying and stability of dairy powders, *Lait* 82 (2002), 475-484
- Roos Y.H., Water in Milk Products, Fox P.F., *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3, Lactose, Water, Salts and Vitamins – Second Edition*, Chapman & Hall, London (1997), 303-346
- Rückold S., Isengard H.-D., Hanss J., Grobecker K.H., The energy of interaction between water and surfaces of biological reference materials, *Food Chemistry* 82 (2003), 51-59

Rückold St., Grobecker K.H., Isengard H.-D., Determination of the contents of water and moisture in milk powder, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* (2000), 522-527

Rüegg M., Moor U., Die Bestimmung des Wassergehaltes in Milch und Milchprodukten mit der Karl-Fischer-Methode, I. Vergleich von 4 käuflichen Titrationslösungen, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 77 (1985), 131-138

Rüegg M., Moor U., Die Bestimmung des Wassergehaltes in Milch und Milchprodukten mit der Karl-Fischer-Methode V. Die Wasserbestimmung von getrockneten Milchprodukten, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 78 (1987), 309-316

Scholz E., Karl-Fischer-Titration, Methoden zur Wasserbestimmung, Springer, Berlin (1984), 1-112

Schuck P., Spray drying of dairy products: state of the art, a review, *Lait* 82 (2002), 375-382

Schuck P., Bouhallab S., Durupt D., Vareille P., Humbert J.-P., Marin M., Séchage des lactosérums et dérivés: rôle du lactose et de la dynamique de l'eau, *Lait* 84 (2004), 243-268

Schweizerisches Lebensmittelbuch (SLMB), Kapitel 4: Milchdauerwaren, Bundesamt für Gesundheit, Bern (2004)

Shah B., Kakumanu V.K., Bansal A.K., Analytical Techniques for Quantification of Amorphous/Crystalline Phases in Pharmaceutical Solids, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (2006), 1641-1665

Shawqi Barham A.S., Kamrul Haque Md., Roos Y.H., Kieran Hodnett B., Crystallization of spray-dried lactose/protein mixtures in humid air, *Journal of Crystal Growth* 295 (2006), 231-240

Sherwin C.P., Labuza T.P., Beyond Water activity and glass transition: A Broad Perspective on the manner by which Water can Influence Reaction Rates in Foods, Del Pilar Buera M. et al. (ed.), *Water properties of food, pharmaceuticals and biological materials*, Taylor & Francis, Boca Raton (2006), 343-371

Thomas M.E. et al., Milk Powders Ageing : Effect on Physical and Functional Properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44 (2004), 297-322

Thomasow J., Mrowetz G., Delfs E.-M., Die Bestimmung des Wassergehaltes von getrockneten Milchprodukten mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration, *Milchwissenschaft* 27 (1972), 76-81

Töpel A., Chemie und Physik der Milch : Naturstoff, Rohstoff, Lebensmittel / 3. neubearbeitete Auflage, Behr's Verlag, Hamburg (2004), 1-131

Verhey J.G., Physical properties of dried milk in relation to chocolate manufacture, *Netherlands Milk and Dairy Journal* 40 (1986), 261-268

Verhey J.G., Bondt H., Verfahren zur Herstellung von Milchpulver, *Deutsche Offenlegungsschrift*, Nr. 3621'110 A1 (1987)

Visser R.A., Bennema P., Interpretation of the morphology of α -lactose hydrate, *Netherlands Milk and Dairy Journal* 37 (1983), 109-137

Vuataz G., Preservation of skim-milk powders: role of water activity and temperature in lactose crystallization and lysine loss, Seow C.C. (Ed.), Food preservation by moisture control, Elsevier Applied Science, London (1988), 73-101

Vugrinec S., Versuche zur Bestimmung von freiem und Gesamtwasser in Laktose mittels Karl-Fischer-Titration, niedrig-auflösender Kernresonanzspektroskopie und Trocknung, Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Hohenheim (2004), 1-91

Walstra P., Jenness R., Dairy chemistry and physics, Wiley-VCH, New York (1984), 27-33

Zähner J., Untersuchung der Griessigkeit des Dicksaftes der Choc Ovo Grundmasse, Diplomarbeit, HEVs, Sion (2005), 1-69

Ziegleder G., Amanitis A., Hornik H., Thickening of molten white chocolates during storage, Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie 37 (2004), 6449-656

Zürcher K., Hadorn H., Arbeitsvorschriften zur Wasserbestimmung in Lebensmitteln nach der Methode von Karl Fischer, Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 70 (1979), 485-496

6.2. Internet-Quellen

- [a] Niro A/S: Methodensammlung (13. Februar 2007). <http://www.niro.dk>
- [b] Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Medizinische Fakultät; Excel-Add-Ins (02. Juni 2007). <http://www1.medizin.uni-halle.de/kac/dbp/drawboxplot.htm>
- [c] Web of Science: Suche in der Datenbank (19.02.2007). <http://isiknowledge.com/wos>

Anhänge

- Anhang 1 Sicherheitsdatenblätter der verwendeten Chemikalien
- Anhang 2 Pflichtenheft für die Analysemethode
- Anhang 3 KF-Standard-Methode SOP_07-09-25 (25. September)
- Anhang 4 KF-Standard-Methode SOP_07-11-02 (02. November)
- Anhang 5 NIR-Spektren
- Anhang 6 DSC-Kurve
- Anhang 7 TGA-Kurven
- Anhang 8 Berechnung der Resultateunsicherheit
- Anhang 9 Metrohm, Thermische Probenvorbereitung in der Karl-Fischer-Titration, KF-Thermoprep 832, Prospekt