

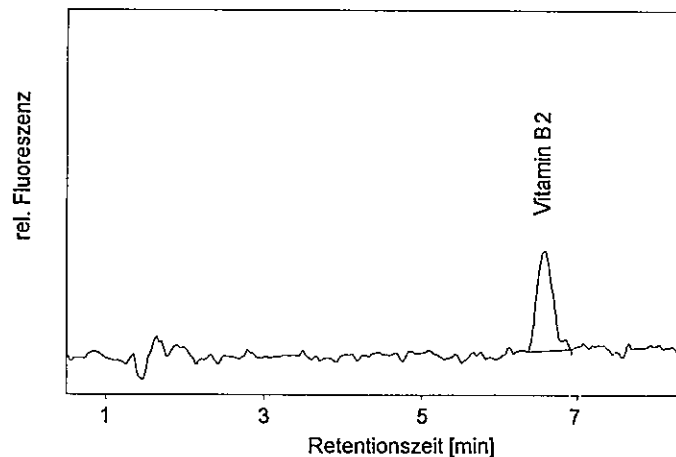
**Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von
Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und
mechanischen Behandlungen sowie nach verschiedenen
langen Belichtungszeiten**

**III. Bestimmung des Vitamin B₂ mit Hilfe einer
neuentwickelten RP-HPLC-Methode**

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

1) Centre de recherche Nestlé
Division qualité et sécurité alimentaire
Vers-chez-les-Blanc
CH-1000 Lausanne 26

2) Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM)
CH-3097 Liebefeld



C

C

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

III. Bestimmung des Vitamins B₂ mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode*

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

III. Determination of Vitamin B₂ Using a New Developed RP-HPLC-Method

E. Tagliaferri

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

und

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

Einleitung

Als mögliche Indikatoren für Veränderungen der Milch infolge verschiedener technologischer Behandlungen wurden in den vorangehenden Arbeiten Ascorbin- und Dehydroascorbinsäure (1) sowie Vitamin B₁ (2) verwendet. In Fortsetzung wird in der vorliegenden Arbeit als weiterer potentieller Indikator das Riboflavin (Vitamin B₂) herbeigezogen.

Milch enthält einen durchschnittlichen Vitamin-B₂-Gehalt von 1,72 mg pro Liter, der zwischen 0,8 und 2,6 mg pro Liter schwanken kann (3). Milch kann zur täglichen Versorgung mit Vitamin B₂ einen bedeutenden Beitrag leisten, der bei

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

einer durchschnittlich konsumierten Milchmenge von etwa 3 dl pro Kopf und Tag (4) mit etwa 30% des empfohlenen Bedarfes von 1,7 mg für den Mann und 1,5 mg für die Frau berechnet wird (5). Der grösste Teil des Vitamins B₂ liegt als Riboflavin vor, je nach Autor zwischen 60 (6), 80 (7) und 90% (8) der gesamten Flavinmenge. Als weitere Vitamere sind in der Milch das Flavinadenindinukleotid (FAD), das 10-(2'-Hydroxyethyl)flavin und das Flavin-5-phosphat (FMN) sowie in geringen Mengen das 10-Formylmethylflavin, das 7 α - und das 8 α -Hydroxyriboflavin (6-8) anzutreffen. Daneben liegen in frisch gemolkener Milch 14% und in handelsüblicher Milch jedoch nur 2% des Vitamins B₂ in proteingebundener Form vor; beim Erhitzen werden die gebundenen Flavine aus den MilCHFettkugelchenmembranen, dem Molkenprotein und dem Casein freigesetzt (9). Deshalb verlangt dieses Vitamin wie das Vitamin B₁ eine saure Hydrolyse vor seiner Bestimmung.

Das wasserlösliche Riboflavin gehört zu den hitzestabilen Vitaminen. Dagegen zeichnet es sich durch eine ausgeprägte Lichtempfindlichkeit aus, vor allem im sauren Bereich, wo es zu Lumichrom umgewandelt wird. Diese Eigenschaft wurde übrigens analytisch ausgenützt (10).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die für das Vitamin B₁ entwickelte Methode (2) auch zur Bestimmung von Vitamin B₂ anzupassen. Ausserdem sollte diese Methode wiederum auf Milch angewendet werden, die verschiedenen technologischen Behandlungen unterworfen wurde. Beachtung wurde dabei auch der Lichtempfindlichkeit des Riboflavins geschenkt. Diese hat bei der Einführung des Schlauchbeutels in der Schweiz zu Diskussionen Anlass gegeben (11).

Experimenteller Teil

Herkunft, Zusammensetzung und Aufbereitung der Milchproben

Die Zusammensetzung der Milch, die verschiedenen angewendeten thermischen und mechanischen Behandlungsverfahren wie auch die Lagerungsbedingungen bei Licht sind in der ersten Arbeit beschrieben (1).

Analysenmethode

Prinzip

Die Proben wurden wie für die Vitamin-B₁-Bestimmung behandelt, d.h. unter Rückfluss heiss hydrolysiert, um sämtliche Formen des Vitamins B₂ als Riboflavin freizusetzen. In gewissen Fällen gewährleistet eine zusätzliche enzymatische Behandlung mit Papain und Takadiastase eine vollständige Freisetzung des Riboflavins. Nach einer Millipore-Filtration wurde diese Komponente mittels RP-HPLC direkt getrennt und mit einer Fluoreszenzdetektion quantitativ bestimmt.

Analysenmessgeräte

HPLC-Analysator
Fluoreszenzdetektor

Hewlett-Packard 1090M
Hewlett-Packard 1046A

Reagenzien und entsprechende Lösungen

Riboflavin für biochemische Zwecke Merck Art. 7609
Essigsäure 100% p.A. Merck Art. 63

Die übrigen Reagenzien (d.h. Natronlauge 1 mol/l gebrauchsfertig, Salzsäure 37% p.A., Natriumacetat-Trihydrat p.A., di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat p.A., N,N-Dimethylformamid p.A., Methanol für HPLC, Wasser mit einer Milli-Q-Anlage) sowie ihre entsprechenden wässrigen Lösungen (d.h. Salzsäurelösung 1 mol/l, Natriumacetatlösung 2,5 mol/l, di-Kaliumhydrogenphosphatlösung 10 mmol/l, eingestellt auf pH 7,2) sind in der vorangehenden Arbeit über die Bestimmung des Vitamins B₁ beschrieben (2).

Zubereitung der Standardlösung

Ungefähr 25 mg Riboflavin auf 0,01 mg genau in einen 500-ml-Messkolben einwiegen, in ca. 350 ml warmem Wasser (bei etwa 60 °C) und 0,6 ml konzentrierter Essigsäure lösen. Mit Wasser zur Marke auffüllen. Diese Stammlösung ist ca. 6 Monate bei 4 °C im Dunkeln haltbar.

Kurz vor Gebrauch 2 ml Stammlösung mit Wasser auf 100 ml verdünnen.

Zubereitung der Probelösung (Hydrolyse)

Die Probelösung wurde wie für die Bestimmung des Vitamins B₁ zubereitet (2). Einzig die Endfiltration mit Rundfilter (Ø 15, Schleicher und Schuell Nr. 593) ist mit einer Mikro-Filtration zu ergänzen (Einwegfilter 0,45 µm, Scan Art. Nr. 4452).

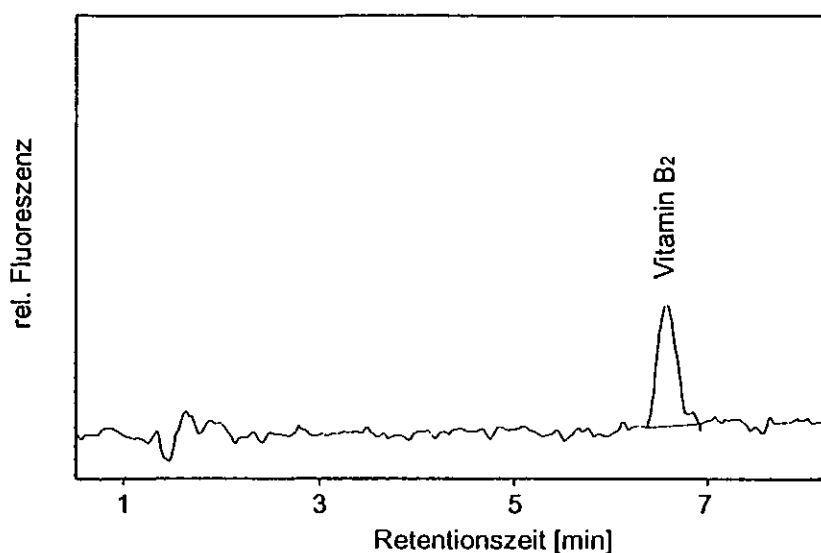


Abb. 1. RP-HPLC-Bestimmung des Vitamin-B₂-Gehaltes von Milch unter Verwendung der Fluoreszenzdetektion

HPLC-Bestimmung

Die Analysenbedingungen sind wiederum die gleichen wie für die Bestimmung des Vitamins B₁ (2). Einzig die Einstellung des Fluorimeters unterscheidet sich dabei:

- Excitation bei 262 nm
- Emission bei 516 nm
- Gain 15
- Cutoff-Filter 470 nm
- Retentionszeit: ca. 6,8 min (siehe Abb. 1).

Resultate und Diskussion

Analytische Aspekte

Vitamin B₂ kann mit Hilfe von Mikroorganismen, mit Fluorimetrie, Polarographie, Dünnschicht- oder Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) analysiert werden.

Bei der mikrobiologischen Methode wird in den meisten Fällen *Lactobacillus casei* verwendet. Dabei wird nicht nur das Riboflavin quantitativ gemessen, sondern auch andere ähnliche Moleküle, die biologisch gleich wirksam sind (12).

Das Riboflavin kann auch direkt mit Hilfe der Fluorimetrie ohne vorherige Derivatisierung bestimmt werden. Diese Technik ist sehr empfindlich, aber besonders störungsanfällig in Anwesenheit von thermisch verursachten Nebenprodukten. Dieser Nachteil lässt sich allerdings meistens durch die Umwandlung von Riboflavin in Lumiflavin beseitigen. Eine andere Möglichkeit, solche Interferenzen auszuschliessen, besteht darin, das Riboflavin mit Natriumdithionit zu zersetzen. Dadurch erhält man einen entsprechenden Blindwert. Bei dieser Reaktion ist allerdings nicht auszuschliessen, dass immer noch störende Substanzen vorhanden sind.

Die dünnschichtchromatographische Bestimmung des Vitamins B₂ wird praktisch nur angewendet, um die einzelnen unterschiedlichen Flavine trennen und qualitativ identifizieren zu können.

Bei Multivitaminpräparaten, noch nicht aber bei Lebensmitteln, kann ebenfalls die Polarographie zur Anwendung gelangen (96).

HPLC ist für die Bestimmung der Flavine und insbesondere des Riboflavins zu bevorzugen (13). Obwohl dabei eine HPLC-Säule mit einer Umkehrphase (ODS) gebräuchlich ist, weil universell anwendbar, sind Normalphasen oder Phasen mit anionischen oder kationischen Harzen zu bevorzugen. Wegen ihrer Selektivität und ihrer hohen Empfindlichkeit ist die fluorometrische Detektion für Nahrungsmittel gut geeignet, so auch für Milch (6–8, 14).

Eine HPLC-Methode mit einer üblichen ODS-Trennsäule und einer neuen mobilen Phase, enthaltend einen Zusatz von 15–20% Dimethylformamid, wurde

für diese Arbeit entwickelt. Damit konnte auf eine Anreicherung mit einem Ionenpaarreagenz verzichtet werden. Ein weiterer Vorteil dieser neuen HPLC-Methode liegt in der gleichzeitigen Bestimmung von Vitamin B₁. Dabei sind nur die entsprechenden Wellenlängen für die Excitation und die Emission anzupassen (2).

Einfluss der thermischen Behandlung

Riboflavin ist als hitzestabil bekannt. Dies haben auch zahlreiche Untersuchungen in pasteurisierter, ultrahocherhitzter, gekochter, sterilisierter, autoklavierter und mikrowellenbehandelter Milch gezeigt (Tabellen 1–3). Einzig bei der Dauerpasteurisation und der Sterilisation von Ziegenmilch wurde ein Riboflavinverlust von mehr als 20% nachgewiesen (Tabellen 1 und 3). Nach *Horak* (36) ergaben sich bei der Hitzebehandlung der Milch im Temperaturbereich von 130–160 °C und Zeiten von 20–3000 s mit zunehmenden Temperatur-/Zeit-Belastungen keine signifikanten Riboflavinverluste.

Tabelle 1. Einfluss verschiedener Pasteurisationsbedingungen auf den Vitamin-B₂-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen
	Temp. (°C)	Dauer (s)				
Holmes, 1945 (15)	72–83	22	fluorom.	1,50	≤ 2	n = 20
Theophilus, 1945 (16)	63	1800	fluorom.	1,73 1,81 1,77	≤ 2	homogenisiert
Chapman, 1957 (17); Ford, 1959 (18)	72	15	fluorom.	1,6	≤ 2	
Nagazawa, 1960 (19)	75	900			4	
Wodsak, 1960 (20)	Kurzzeitpast.		mikrob.	1,95	7	n = 4
Blanc, 1980 (21)	72 92	15 20			} ≤ 2	
Eitenmiller, 1983 (22); Goldsmith 1983 (23)	63 72 88	1800 15 5	mikrob.	0,34	} ≤ 2	Muttermilch
Haddad, 1984 (24)	72 80	16 16	fluorom.	1,33	} ≤ 2	
Ford, 1986 (25)	72 82	15 15	mikrob.	1,5	} ≤ 2	
Zoeren-Grobben, 1987 (26)	62,5	1800	HPLC		6	Muttermilch
Lavigne, 1989 (27)	76 81 85 63,5	16 16 4 1800	HPLC	1,5	3 ≤ 2 6 ~27	Ziegenmilch

Tabelle 2. Einfluss verschiedener UHT-Verfahren auf den Vitamin-B₂-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungs- methode	Gehalt der Ausgangs- milch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangs- milch)	Bemerkungen	
	Temp. (°C)	Dauer (s)					
Bernhard, 1953 (28)	d	150	1	mikrob.	2,49	6	Vergleichs- probe: past.
Chapman, 1957 (17); Ford, 1959 (18)		135	2	fluorom.	1,6	6	
Nagazawa, 1960 (19)		135	2			5	
Lhuissier, 1962 (29)	d			mikrob.	1,95	≤ 2	
Lembke, 1968 (30)	d i			mikrob.	2,17 1,87	4-8 8	6 Verfahren
Ford, 1969 (31)	i	138	2	fluorom.	2,0 1,9	≤ 2 ≤ 2	2 Verfahren
Karlin, 1969 (32)					1,67	8	
Rossikhina, 1969 (33)	d i	145			1,26	≤ 2	
Ferretti, 1970 (34)	d	140		mikrob.	1,59	7	1,8% Fett
Thomas, 1975 (35)	i	141	3,6	fluorom.	1,92	10	
Blanc, 1980 (21)	d i	150 141	2,3			≤ 2	
Görner, 1980 (10)	d	140	3-4	Lumifla- vin	1,91	≤ 2	
Horak, 1980 (36)		130 140 150 160	50-5000 50-3000 40-3000 20-600	mikrob.	1,4 1,4/1,7 1,4/1,7 1,7/1,4	≤ 2-8 ≤ 2-13 ≤ 2-23 ≤ 2-13	Verluste korre- lieren nicht mit der Dauer
Haddad, 1983 (24)		140 110	3,5 3,5	fluorom.	1,30	3 ≤ 2	
Blanc, 1984 (37)	d	150	2,4			≤ 2	
Oamen, 1989 (38)		138 149	20,3 3,4		1,86	≤ 2 3	
Lavigne, 1989 (27)	i	135		HPLC	1,5	~8	Ziegenmilch

Abkürzungen: d = direkt; i = indirekt

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

Tabelle 3. Einfluss verschiedener anderer Erhitzungsverfahren auf den Vitamin-B₂-Gehalt der Milch

Erstautor, Jahr	Erhitzungsverfahren		Bestimmungs- methode	Gehalt der Aus- gangs- milch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangs- milch)		Bemerkungen
	Temp. (°C)	Dauer (s)					
Williams, 1942 (39)	K		2700			≤ 2	ohne Lichteinfluss
Stamberg, 1945 (40)	K		1800	fluorom.	1,76	11 12 ≤ 2	Glas, Aluminium- pfanne, Alupfanne zugedeckt
Mijll Dekker, 1952 (41)	S			fluorom.	1,85–2,3	≤ 2	n = 8
Bernhard, 1953 (28)	A			mikrob.	2,49	4	Vergleichsprobe: past.
Chapman, 1957 (17); Ford, 1959 (18)	S S U + S	107 111			1,6	6 6 6	
Wodsak, 1960 (20)	K		300	mikrob.	2,33	4	n = 4
Wodsak, 1960 (20)	A	110	3600	mikrob.	1,85	≤ 2	n = 4
Ford, 1967 (42)	S	111	20	mikrob.	~4,8	7 16	nach 3 Tagen bei 2 oder 21 °C
Eitenmiller, 1983 (22); Goldsmith, 1983 (23)	K	100	5	mikrob.	0,34	≤ 2	Muttermilch
Lavigne, 1989 (27)	S	121	900	HPLC	1,5	~22	Ziegenmilch
Demel, 1990 ()	M				1,74	≤ 2	200 ml in 2,5 min auf 96 °C
Sikkaa, 1990 (43)	S				1,94 1,59	3 5	Kuhmilch, Büffelmilch

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

Einfluss der Homogenisation

Die wenigen Angaben in der Literatur zeigen keinen Einfluss der Homogenisation auf den Riboflavingehalt der Milch auf (Tabelle 1), was auch für gelagerte homogenisierte Milch gilt (Tabelle 4). Auch die eigenen Resultate bestätigen dies (Abb. 3).

Einfluss der Lagerungsdauer

Über den Einfluss der Lagerungsdauer auf den Vitamin-B₂-Gehalt von Milch liegt eine Vielzahl von Resultaten vor, die jedoch widersprüchlich sind (Tabelle 4). Je nach den Lagerungsbedingungen wurden in einzelnen Arbeiten Vitamin-B₂-Verluste nachgewiesen, die bis zu 25% betragen. Diese Verluste während der Lagerung

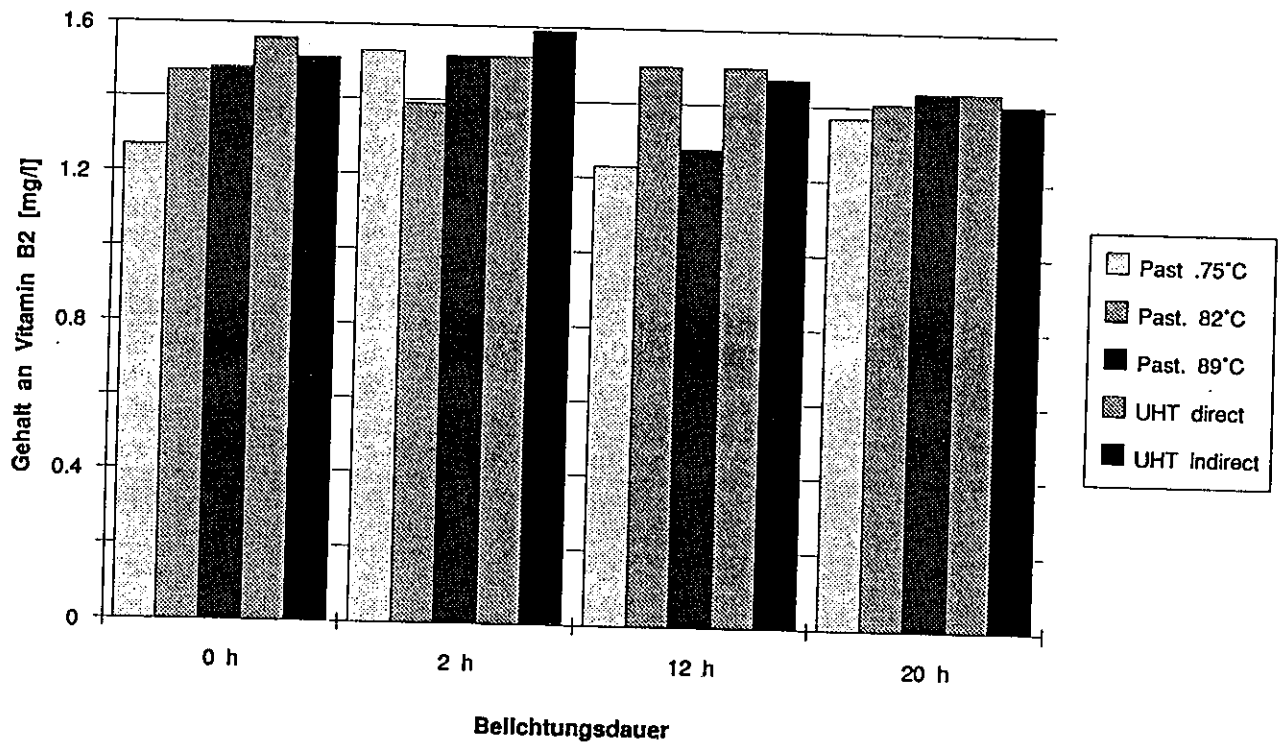


Abb. 2. Einfluss der thermischen Behandlung und der Belichtungsdauer auf den Vitamin-B₂-Gehalt der Milch

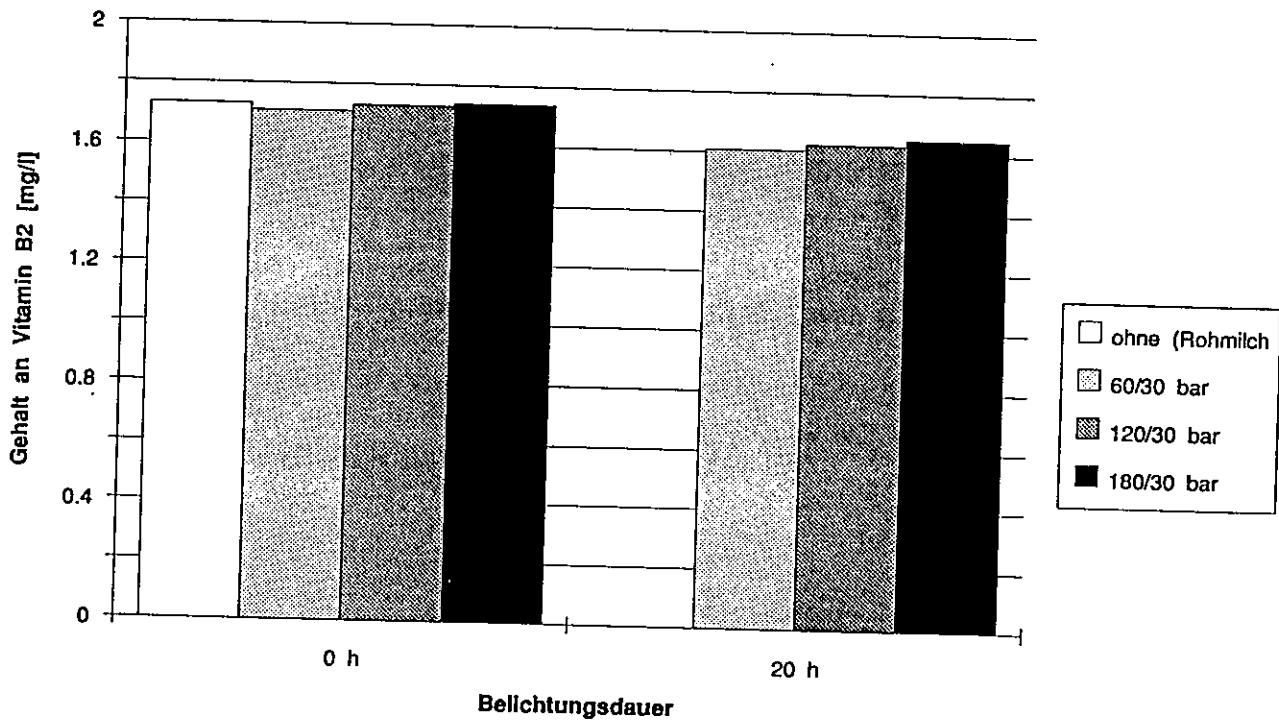


Abb. 3. Einfluss der mechanischen Behandlung (Homogenisation) und der Belichtungsdauer auf den Vitamin-B₂-Gehalt von pasteurisierter Milch

Tabelle 4. Einfluss der Lagerung auf den Vitamin-B₂-Gehalt von roher, pasteurisierter, ultrahocherhitzer und sterilisierter Milch

Erstautor, Jahr	Milch	Lagerungsbedingungen		Verpackung	Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen bsp. Aufbewahrung
		Temp. (°C)	Dauer (d)					
Theophilus, 1945 (16)	P	4	1		fluorom.	1,72 1,80 1,81 1,74 1,79 1,81	für sämtliche ≤ 2	unhomogen. homogenisiert
Mijll Dekker, 1952 (41)	s	RT 37	180	G	fluorom.		~5 ~8	im Dunkeln
Causeret, 1961 (44)	s	4 20 38	182	G weiss	mikrob.	1,03	≤ 2	im Dunkeln
Hugot, 1962 (45)	s		182	G			≤ 2	im Dunkeln
Lembke, 1968 (30)	Ud Ui		28 28		mikrob.	2,04 1,72	3-5 ≤ 2	6 Verf. dir.
Ford, 1969 (31)	Ui Ud	15-19	90	Ka	fluorom.	2,0 1,9 1,8	für sämtliche ≤ 2	Ud bezogen auf Rohmilch
Ferretti, 1970 (34)	U	5 20 37 5 20 37	30 90		mikrob.	1,48	7 9 12 14 19 16	im Dunkeln
Hedrick, 1975 (46)	P	4	10	Ka Plastik	fluorom.	1,66 1,67	≤ 2 ≤ 2	n = 11 im Dunkeln
Thomas, 1975 (35)	Ui	23	62		fluorom.	1,70 1,72	13 8	8,4 ppm O ₂ < 1 ppm O ₂
Goussault, 1978 (47)	P	6	6	Ka Plastik	mikrob.	1,72	6 18	im Dunkeln
Görner, 1980 (48)	Ud	6 RT 37	70	Papier + Alu + PE-Folie	Lumiflavin	1,86	10 ~13 ~25	

Erstautor, Jahr	Milch	Lagerungsbedingungen		Verpackung	Bestimmungsmethode	Gehalt der Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (% der Ausgangsmilch)	Bemerkungen bsp. Aufbewahrung
		Temp. (°C)	Dauer (d)					
Horak, 1980 (36)	Udi	RT	42		mikrob.	1,77 1,68	≤2 ≤2	
Eitenmiller, 1983 (22)		-20	14		mikrob.	0,34	7	Muttermilch
Goldsmith, 1983 (23)		-20	28					
Haddad, 1983 (24)	P U	-40 -40	14 14		fluorom.	1,30-1,32	≤2 ≤2	
Fanelli, 1985 (48)		1,5	3	Ka	HPLC	1,5	7	im Dunkeln
Schröder, 1985 (50)	p	7	90 h	Ka, PE	mikrob.	1,5	≤2 ≤2	im Dunkeln
Ford, 1986 (25)	p	4,5	14	G	mikrob.	1,5	≤2	im Dunkeln
Kneifel, 1986 (51)	Ui	5 20	140 140	Ka	HPLC	2,24	20 20	Bezugsbasis: frische Milch
Lavigne, 1989 (27)	P Ui	7 7	21 21	Erlenmeyer, Plastik + Alu	HPLC		10-25 10	unter Luft unter Vakuum
Oamen, 1989 (38)	Ud	24	140	Ka			≤2	
Mohammad, 1990 (52)	K S Z B		6 h	opaker Behälter		1,76 3,42 1,24 1,32	22 15 22 14 22 14 20 14	1. Reihe mit O ₂ 2. Reihe ohne O ₂ im Dunkeln
Dolfini, 1991 (53)	Ud Ui	5 20	90	Ka		4,9	≤2 5 3 4	B ₂ zugesetzt

Abkürzungen: K = Kuhmilch; S = Schafmilch; Z = Ziegenmilch; B = Büffelmilch
r = roh; p = pasteurisiert; U = UHT; d = direkt; i = indirekt; s = sterilisiert
G = Glas; Ka = Karton; PE = Polyethylenflaschen; RT = Raumtemperatur

könnten auf einen eventuell ungenügenden Schutz der Milch gegenüber Licht (z. B. eine geringe Lichtdurchlässigkeit der Verpackung) zurückgeführt werden.

Einfluss des Sauerstoffs

Riboflavin scheint gegenüber Sauerstoff nicht empfindlich zu sein. Die Untersuchungen von *Thomas et al.* (35), *Lavigne et al.* (27) sowie von *Mohammad et al.* (52) zeigten zwischen den Proben, die mit und ohne Sauerstoff, d. h. mit Luft oder unter Vakuum, gelagert wurden, Unterschiede im Vitamin-B₂-Gehalt in der Größenordnung von kleiner als 10% (Tabelle 4), was analytisch als nicht signifikant betrachtet werden muss.

Einfluss von Licht und γ -Bestrahlung

Riboflavin ist ein sehr lichtempfindliches Vitamin. Bei der lichtinduzierten Zerstörung dieses Vitamins in Milch spielen der Wellenlängenbereich und die Intensität der Lichtquelle, die Expositionsdauer und -temperatur sowie die Lichtdurchlässigkeit des Verpackungsmaterials eine entscheidende Rolle. Riboflavin besitzt mehrere Absorptionsbanden, die im UV-Bereich ihre Maxima bei 223 und 268 nm und im sichtbaren Spektrum bei 359–375 und 446–475 nm aufweisen (Abb. 4), wobei die stärkste Schädigung des Riboflavins zwischen 415 und 455 nm zu beobachten ist (55). Bei diesen Wellenlängen kann auch ein lichtinduzierter Nachgeschmack (off-flavor: «Lichtgeschmack») entstehen. Sonnenlicht, Licht bei bedecktem Himmel oder Fluoreszenzlicht haben in Abhängigkeit von der Expositionsdauer unterschiedliche Auswirkungen auf den Riboflavingehalt. Verpackungsmaterialien wie Glas, Polyethylen- oder Polystyrolflaschen, die mit einer lichtabsorbierenden Farbe eingefärbt sind, können ein Produkt vor der Photooxidation schützen (56). In den folgenden Abbildungen 5–8 sind die Emissionsspektren des Sonnenlichtes und verschiedener Fluoreszenzröhren sowie die Durchlässigkeit von üblichen Verpackungsmaterialien für Joghurt und für pasteurisierte Milch (inklusive der lichtdurchlässigen Milchbeutel) dargestellt. Die schraffierte Zone in diesen Abbildungen entspricht der dritten Absorptionsbande des Riboflavins im sichtbaren Bereich (Abb. 4), die für weitere Reaktionen der Photooxidation der Milch massgebend ist. Die zwei ersten Absorptionsbanden des Riboflavins wurden hier nicht speziell berücksichtigt, denn diese beiden werden durch die meisten verwendeten Verpackungen für Milch und Milchprodukte absorbiert und sind deswegen für die Lichtempfindlichkeit dieser Lebensmittel nicht relevant.

Der Einfluss der Lichtbestrahlung der Milch auf deren Riboflavingehalt wurde von verschiedenen Autoren intensiv bearbeitet. Die Auswirkungen einer γ -Bestrahlung dagegen wurden nur von *Ford et al.* (60) behandelt. Diese Autoren haben starke Riboflavinverluste festgestellt (Tabelle 5). In Abhängigkeit vom Lichttyp (Abb. 5 und 6), von der Verpackung (Abb. 7 und 8) und von den angewendeten Zeit- und Temperatur-Bedingungen wurden in bezug auf die Vitamin-B₂-Verluste in roher, pasteurisierter und sterilisierter Milch die unterschiedlichsten Resultate

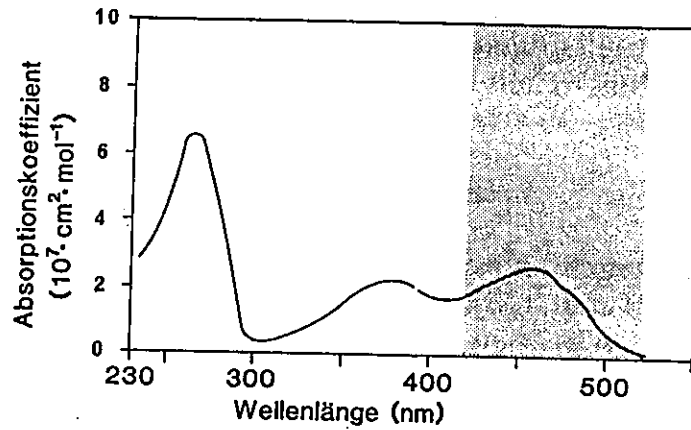


Abb. 4. Absorptionsspektrum von Riboflavin (nach 54)

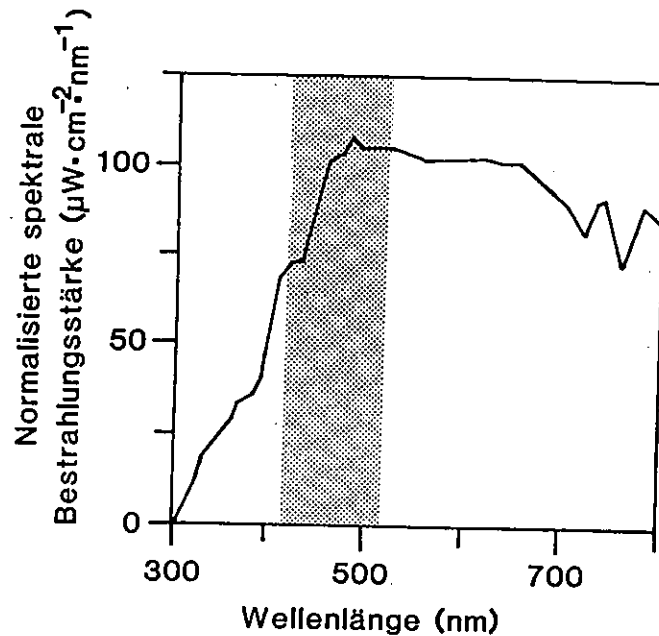


Abb. 5. Emissionsspektrum des Sonnenlichtes (nach 57)

gefunden. Bereits nach einer zweistündigen Exposition in Sonnenlicht kann der Riboflavingehalt von Milch, die sich in einem farblosen Glas befindet, um mehr als die Hälfte abgesunken sein (Tabelle 5). In eigenen Untersuchungen hatte die Belichtungsdauer bei pasteurisierter, unterschiedlich homogenisierter Milch (Abb. 2) und thermisch verschieden behandelter Milch (Abb. 3) bei sehr milden Bedingungen (750 lx, warmweisses Licht, 20 h) nur geringfügige Auswirkungen auf den Riboflavingehalt.

Über den Mechanismus der Riboflavinphotolyse liegen verschiedene Angaben vor. Kinetisch lässt sich nach *Singh et al.* (80) wie auch nach *Allen und Parks* (81) die Riboflavinabnahme in der Milch mit einer Reaktion 1. Ordnung beschreiben. Bei einer Bestrahlung mit Fluoreszenzlicht von 2690 lx betrug die Reaktionskonstante k für Magermilch $1,86 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ und für Vollmilch $1,47 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (81). Dabei ist die Reaktionskonstante von der angewendeten Lichtintensität abhängig (82).

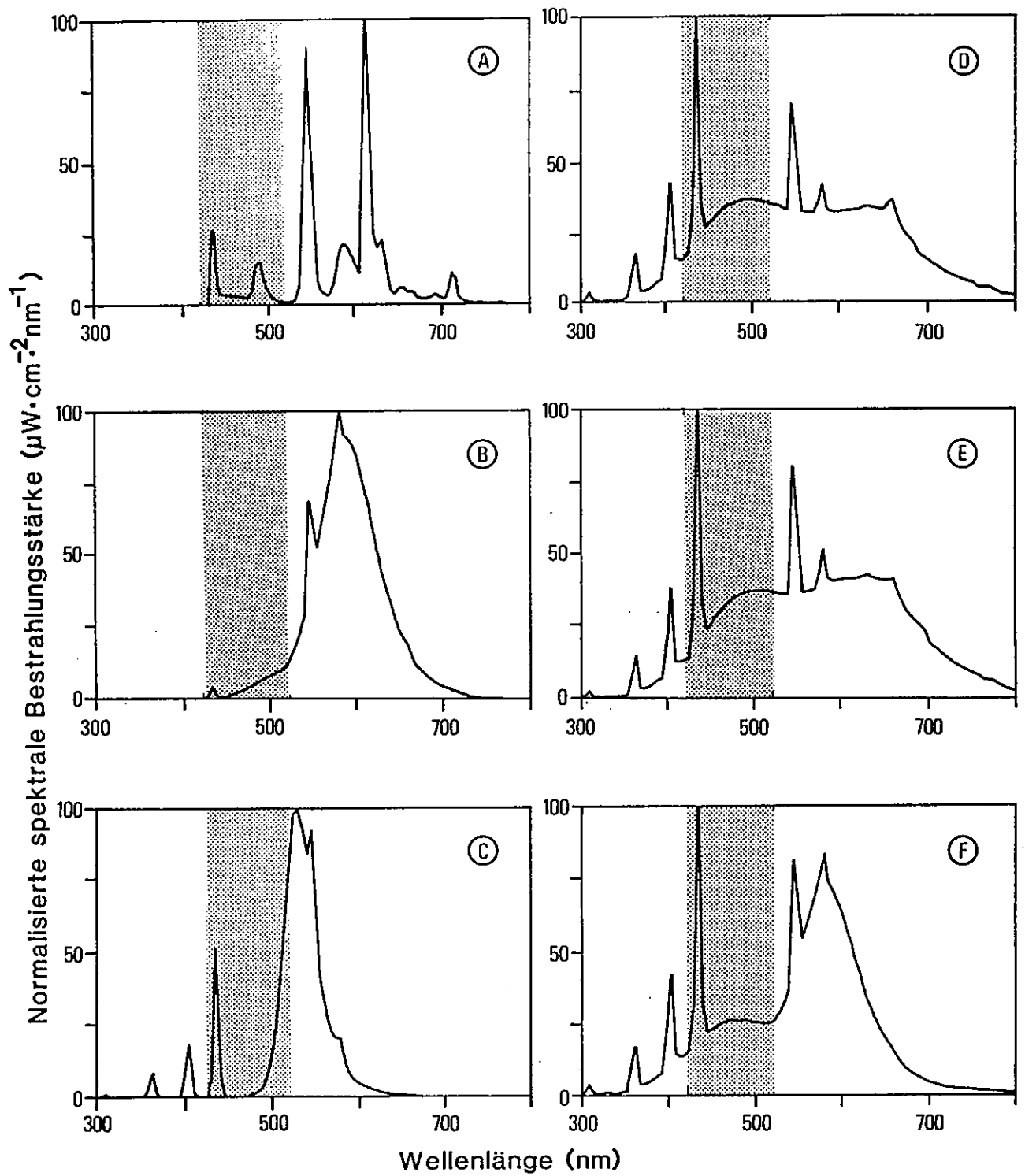


Abb. 6. Emissionsspektren einiger kommerzieller Fluoreszenzröhren (nach 58)

- A Philips 83/36 W weiss
- B Philips 16/40 W gelb
- C Philips 17/40 W grün
- D Philips 55/40 W Tageslicht
- E Osram 19/40 W Tageslicht
- F Philips 33/40 W weiss

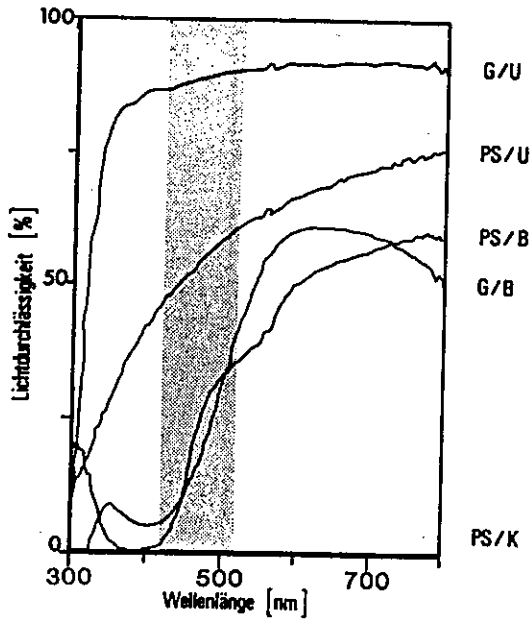


Abb. 7. Durchlässigkeit von üblichen Verpackungsmaterialien für Joghurt (nach 59)

G/U: ungefärbtes Glas
 PS/U: ungefärbtes Polystyrol
 PS/B: braunes Polystyrol
 G/B: braunes Glas
 PS/K: kartoniertes Polystyrol

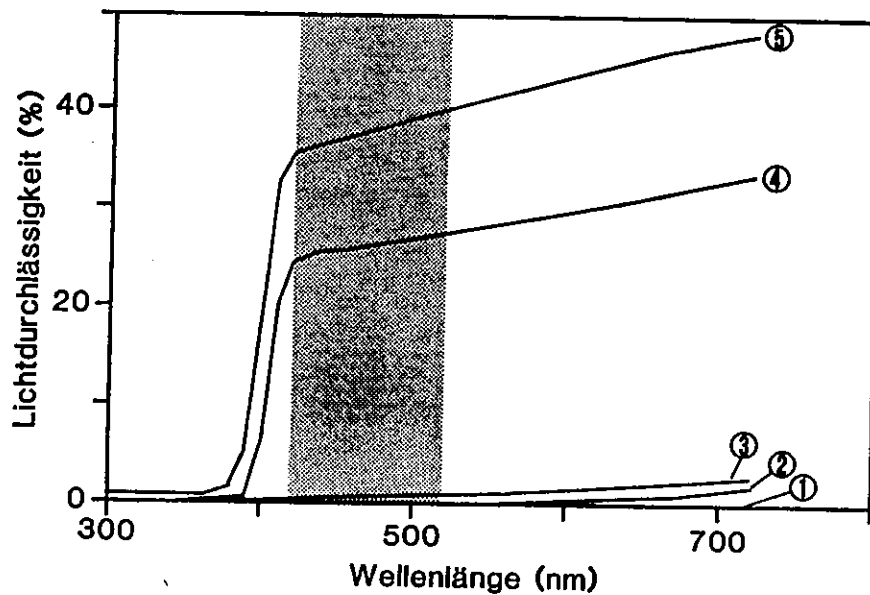


Abb. 8. Durchlässigkeit von üblichen Verpackungsmaterialien für pasteurisierte Milch (Beutel)

1 = Kunststoffolie mit Lichtschutz (schwarz)
 2 = Kartonfolie ohne Alufolie
 3 = Kunststoffolie mit Lichtschutz (braun)
 4 und 5 = Kunststoffolien ohne zusätzlichen Lichtschutz

Diese Spektren wurden von der EMPA, Dübendorf, im Auftrage der Toni-MIBA-Produktions AG, Zürich, aufgenommen. Wir danken den Herren Dr. M. Morgenthaler und A. Speck für die freundliche Erlaubnis, diese Spektren hier abzdrukken.

Tabelle 5. Einfluss der Licht- und γ -Bestrahlung auf den Vitamin-B₂-Gehalt von Milch

Erstautor, Jahr	Milch	Lichttyp	Verpackung	Bedingung		Gehalt Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (%)	Bemerkungen
				Dauer	Temp. (°C)			
Williams, 1942 (39)		diffuses Licht		5 m 0,5 h			26 48	Kochen unter Licht- einfluss
Peterson, 1944 (61)	r	Sonnenlicht	G we	1 h 3 h	15,5-22	1,90	36 72	4 Serien
Ziegler, 1944 (62)	r/ p	Sonnenlicht	G we	2 h	16,7-20,6	2,06 1,92	57 61	
Holmes, 1945 (63)	p	Sonnenlicht	G we	2 x 1 h		1,66	66	n = 9
Stamberg, 1945 (40)	r/p/ ph ph	Sonnenlicht diffuses Licht Sonnenlicht	G kl G kl/G br Ka	2 h 2 h 6 h		1,62/1,64/1,63 1,78	40 35 28 7 4 3 78 6	4 versch. Kartons
Josephson, 1946 (64)	h	Sonnenlicht	G we	2 h			44	
Herreid, 1952 (65)	ph	Sonnenlicht	G we G gr/Ka	2 h			60 bis 80 ≤ 2	
Mijl Dekker, 1952 (41)	s	diffuses Licht	G	180 d	RT		60	
Kon, 1953 (66)	p	Sonnenlicht: Febr.-Mai Sonnenlicht: Juni-Aug.	G we	6-7 h		1,54-1,86	20 50	
Funai, 1956 (67)	p	Sonnenlicht Sommer/Winter		2 h		1,78/1,94 1,82/1,96 1,89/1,89	93 31 46 16 30 10	Himmel klar bewölkt bedeckt
Causeret, 1961 (44)	s	diffuses Licht Sonnenlicht und künstl. Licht	G we	14 d 14 d	20 38	1,03	83 96	
Hugot, 1962 (45)	s	stark abgeschwächt	G we G amber	42 d	RT	0,16	100 20 50 ≤ 2	
Somogyi 1962 (68)	p	Leuchtstoffr. we, warm- we, gelb, rot	G we G br Ka	6 h			40 26 16 17 24 21 10 14 14 9 8 11	

Erstautor, Jahr	Milch	Lichttyp	Verpackung	Bedingung		Gehalt Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (%)	Bemerkungen
				Dauer	Temp. (°C)			
Ford, 1966 (60)		γ -Bestrahlung 0,25 1,0 Mrad				1,55 1,55	62 73 77 40 52 59	fluorom. mikrob.
Ford, 1967 (42)	s	Sonnenlicht		8 h		~1,7	~90	
Kiermeier, 1969 (69)	P	diffuses Tageslicht Sonnenlicht	PE	6 h		~2,4	~40 ~90	
Ferretti, 1970 (34)	Ui	indirektes Licht		30 d 90 d	20 37 20 37		19 16 26 27	
Dimick, 1975 (70)	P	Fluoreszenzl. kalt-we	Plastik	5 d	7	2,8	17	
Fukumoto, 1975 (71)		Fluoreszenzlicht we	Petrischale	3 h			60	
Hedrick, 1975 (46)	P	Fluoreszenzlicht	Ka Plastik	5, 10, 24 h	4	1,66 1,67	20 30 10 3 4 3 5 7 8	Filter blau, br, rot n = 11
Paik, 1976 (72)		Sonnenlicht	G kl	2 h			90	
deMan, 1978 (73)		Fluoreszenzl. 2200 lx Fl. kalt-we, kalt-we und Filter, warm-we	Ka, Beutel Ka Plastik	48 h	4		13-28 17 11 15 19 13 17	
Hoskin, 1979 (74)	P	Fluoreszenzl. 1076 lx	G, PC, PE	72 h	7		27 13 10	
Desarzens, 1983 (75)	P	Fluoreszenzl. 20000 lx		7 h		1,9	~85	Methode: HPLC
Bates, 1985 (76)	r	Tageslicht	PE	7 h			~50	Muttermilch
Fanelli, 1985 (49)		Fluoreszenzl. 35W we	Ka	16 h	1,5		~55	
Schröder, 1985 (50)	P	4000 lx	PE Ka	90 h	7	1,5	31 37 0	2 Versuche
Gaylord, 1985 (77)		Fluoreszenzlicht 1614 lx	Ka	48 h	4		55 64 70	Vollmilch 2% Fett. Magermilch
Ford, 1986 (25)	P	4000 lx	G	14 d	4,5	~1,5	~80 ~60	Past. 72 82 °C
Hoskin, 1988 (78)	P	Fluoreszenzlicht 4300 lx	PE, PE + Alu	72 h	6	0,84 0,79	13 1	

Erstautor, Jahr	Milch	Lichttyp	Verpackung	Bedingung		Gehalt Ausgangsmilch (mg/l)	Verluste (%)	Bemerkungen
				Dauer	Temp. (°C)			
Renner, 1988 (79)	P	700 1500 2300 lx	G kl		12 h		25-40	
Mohammad, 1990 (52)	K	Fluoreszenzlicht Sonnenlicht	opaker Behälter	6 h		1,76	56 39	1. Reihe mit O ₂ 2. Reihe ohne O ₂
	S	Fluoreszenzlicht Sonnenlicht				3,42	64 45	
	Z	Fluoreszenzlicht Sonnenlicht				1,24	59 39	
	B	Fluoreszenzlicht Sonnenlicht				1,32	66 49	
		Fluoreszenzlicht Sonnenlicht					59 39	
Sikka, 1990 (43)	K	Fluoreszenzlicht Sonnenlicht Fluoreszenzlicht Sonnenlicht	schwarz lackierte Flaschen	2 h 1 h 2 h 1 h		1,94	26	Bezugsbasis: 1 h bei RT gelagerte Milch
						1,59	83	
							22	
							77	

Abkürzungen: h = homogenisiert; PC = Polykarbonat; br = braun; gr = gelbrot; kl = klar; we = weiss;
übrige Abkürzungen: siehe Tabelle 4

Nach *Nordlund* (83) folgt die Photolyse des Riboflavins bei einer Lichtintensität von 40 000 – 44 000 lx einer Reaktion 0. Ordnung mit einer mittleren Aktivierungsenergie von $23 \cdot \text{kJ mol}^{-1}$ (Temperaturbereich: 10–50 °C). Als wichtigstes Produkt entsteht beim Photoabbau von Riboflavin in Milch Lumichrom. In Modellsystemen, in denen der Photoabbau von der Wellenlänge, der Expositionsdauer, der Gegenwart von Sauerstoff und Elektronendonatoren wie auch vom pH des Mediums abhängt, konnte auch Lumiflavin nachgewiesen werden (84). Bei der Photolyse von Riboflavin entsteht in Milchserum wie auch in einer wässrigen Standardlösung von Riboflavin aktiver Sauerstoff, was mit der Bestimmung von Superoxidanion (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) im Milchserum gezeigt werden konnte (85–87). Das Superoxidanion kann dabei eine spontane Dismutation in Peroxid (O_2^{-2} oder H_2O_2) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) oder eine durch das Enzym Superoxiddismutase katalysierte Dismutation in Peroxid und Triplett-Sauerstoff ($^3\text{O}_2$) erfahren (87–89). Daneben spielen Einflussfaktoren wie verschiedene Aminosäuren, Vitamine und Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen eine Rolle (87, 90). Im weiteren kann Riboflavin auch als Photosensibilisator bei Redoxreaktionen wirken (87–89, 91–94), und es wurde bereits eine nachträgliche antioxidative Wirkung des Riboflavins nach Bestrahlung von wässrigen Lösungen beschrieben (86). In Milch handelt es sich bei dieser antioxidativen Komponente um proteingebundenes Riboflavin (95).

Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit schlägt eine neue quantitative, fluorometrische RP-HPLC-Bestimmung des Vitamins B₂ der Milch vor. Diese neue Methode bietet mehrere Vorteile gegenüber anderen Analysenmethoden. Sie ist schnell, sehr empfindlich (Nachweisgrenze: 20 µg/kg für ein chromatographisches Signal-/Rauschpegel-Verhältnis von 3), reproduzierbar (ca. ± 10%) und frei von Interferenzen und Artefakten. Mit kleinen Änderungen kann diese Analysenmethode auch bei anderen Milchprodukten wie Joghurt und Käse angewendet werden. Ausserdem ist sie praktisch identisch mit der für das Thiamin vorgeschlagenen Methode, aber ohne Oxidationsstufe und mit einer anderen Einstellung des Fluorimeters.

Riboflavin ist stabil gegen Hitze-, Homogenisations- und Sauerstoff-Einwirkungen, aber hochempfindlich gegen Licht. Bei den normalen Bedingungen des Pasteurisierens und der Ultrahoherhitzung sowie den meisten anderen Erhitzungsbedingungen liegen die Riboflavinverluste in der Mehrzahl der Untersuchungen unter 10%, was ungefähr dem üblichen analytischen Messfehler entspricht. Eigene Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit bestätigen die meisten veröffentlichten Angaben. Die Riboflavinverluste während der Lagerung von Milch sind abhängig von den angewendeten Temperatur- und Zeit-Bedingungen und sollten wiederum anhand der entsprechenden Methodenstreuung betrachtet werden. Deshalb ist das Riboflavin in Milch nur ein Lichtindikator.

Dank

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

Zusammenfassung

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung einer neuen fluorometrischen RP-HPLC-Bestimmungsmethode für das Vitamin B₂ in Milch und Milchprodukten. Diese Methode ist praktisch identisch mit der bereits vorgeschlagenen Methode für das Vitamin B₁ mit dem Unterschied, dass hier der Oxidationsschritt entfällt und eine andere Einstellung des Fluorimeters verwendet wird. Als zweites Ziel wurde das Verhalten dieses Vitamins als eventuelles Kriterium für Veränderungen der Milch studiert, die verschiedenen mechanischen und thermischen Behandlungen wie Pasteurisation bei 75, 82 und 89 °C, UHT direkt und indirekt unterworfen wurde. Bei der Reproduzierbarkeit der vorgeschlagenen Methode ($\pm 10\%$) ergaben diese Behandlungen keine signifikanten Verluste des Vitamins B₂. Diese Resultate bestätigen übrigens die in der Literatur vorhandenen Befunde. Diese Verbindung ist also wie erwartet kein interessantes Kriterium, mit dem Veränderungen der Milch nach verschiedenen technologischen Behandlungen gemessen werden können. Eine kurze bibliographische Übersicht als drittes Ziel dieser Arbeit zeigte auf, dass nur Lichtbestrahlungen (Sonne, Fluoreszenzlicht) zu ausgeprägten Vitamin-B₂-Verlusten der Milch führen.

Résumé

Le premier objectif du présent travail est la mise au point d'une nouvelle méthode de dosage de la vitamine B₂ par RP-HPLC dans le lait et les produits laitiers. Cette méthode est pratiquement identique à celle précédemment proposée pour le dosage de la vitamine B₁, mais procède sans étape d'oxydation et avec un autre réglage du fluorimètre. Son deuxième objectif est l'étude de la vitamine B₂ en tant que critère éventuel de l'altération du lait soumis à divers traitements mécaniques et thermiques tels que pasteurisation à 75, 82 et 89 °C, UHT direct et UHT indirect. A la reproductibilité près du dosage proposé, soit environ $\pm 10\%$, aucune perte significative en vitamine B₂ n'a pu être mise en évidence par suite de tels traitements, ce qui indique que ce composé n'est pas un critère intéressant pour mesurer l'altération d'un lait soumis à divers traitements technologiques. Ces résultats confirment d'ailleurs ceux trouvés dans la littérature dans le cadre d'une brève revue bibliographique, troisième et ultime objectif du présent travail. Dans son ensemble, cette dernière indique en effet que seule la lumière peut causer des pertes sensibles en vitamine B₂ dans le lait.

Summary

The first purpose of this work was to develop a new method for the determination of vitamin B₂ by RP-HPLC in milk and milk products. This method is practically identical with the method for vitamin B₁, but without oxidation and with another setting of the fluorimeter. Its second purpose was to study the behaviour of this vitamin as a possible criterion for

deteriorations of milk subjected to different mechanical or heat treatments such as pasteurization at 75, 82 and 89 °C as well as UHT direct and indirect. No significant loss of vitamin B₂ due to these treatments was observed, the reproducibility of the proposed method being approximately $\pm 10\%$. The results confirm those found in the literature. This compound is therefore not an interesting criterion for deteriorations of milk subjected to different technological treatments. A review, as the third objective of this paper, shows that only sunlight or fluorescent light can lead to marked vitamin B₂ losses in milk.

Literatur

1. *Bosset, J.O., Eberhard, P., Bütikofer, U., Sieber, R. et Tagliaferri, E.*: Evaluation de quelques critères d'altération du lait entier soumis à divers traitements thermiques et mécaniques ainsi qu'à diverses durées d'exposition à la lumière. Partie I. Etude de la vitamine C. *Trav. chim. aliment. hyg.* 82, 433–456 (1991).
2. *Tagliaferri, E., Bosset, J.O., Eberhard, P., Bütikofer, U. und Sieber, R.*: Untersuchung einiger Kriterien zum Nachweis von Veränderungen der Vollmilch nach thermischen und mechanischen Behandlungen sowie nach verschiedenen langen Belichtungszeiten. Teil II: Bestimmung des Vitamins B₁ mit Hilfe einer neuentwickelten RP-HPLC-Methode. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 83, 435–452 (1992).
3. *Renner, E.*: Milch und Milchprodukte in der Ernährung des Menschen. 4. Aufl. Volkswirtschaftlicher Verlag, München 1982.
4. *NN*: Milchstatistik der Schweiz 1990. Statistische Schriften Nr. 160. Schweiz. Bauernsekretariat, Brugg 1991.
5. *Deutsche Gesellschaft für Ernährung*: Empfehlungen für die Nährstoffzufuhr, 5. überarbeitete Auflage. Umschau Verlag, Frankfurt 1991.
6. *Roughead, Z.K. and McCormick, D.B.*: Qualitative and quantitative assessment of flavins in cow's milk. *J.Nutr.* 120, 382–388 (1990).
7. *Kanno, C., Shirabuji, K. and Hoshi, T.*: Simple method for separate determination of three flavins in bovine milk by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 56, 678–681 (1991).
8. *Bilic, N. und Sieber, R.*: Über das Vorkommen von Vitamin B₂ in Milch, Joghurt und Käse. *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* 19, 71–72 (1990).
9. *Kanno, C., Kanehara, N., Shirafuji, K., Tanji, R. and Imai, T.*: Binding form of vitamin B₂ in bovine milk – its concentration, distribution and binding linkage. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 37, 15–27 (1991).
10. *Görner, F. und Uherova, R.*: Retention von einigen Vitaminen während der Ultrahocherhitzung von Milch. *Nahrung* 24, 713–718 (1980).
11. *Eberhard, P. und Gallmann, P.U.*: Ungenügender Lichtschutz für Milch im Schlauchbeutel. *Schweiz. Milchztg.* 117 (26), 3 (1991).
12. *Augustin, L., Klein, B.P., Beckers, D. and Venugopol, P.B.*: Methods of vitamin assay, 4. ed. J. Wiley, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore 1984.
13. *Marletta, M.A. and Light, D.R.*: Flavins. In: Leenheer, A.P.de, Lambert, W.E. and Ruyter, M.G.M. de, *Modern chromatographic analysis of the vitamins*. M. Dekker, New York, Basel, 413–433 (1985).
14. *Kneifel, W.*: Fluorimetrische HPLC-Bestimmung von Riboflavin in Milch. *Deut. Molk. Ztg.* 107, 212–213 (1986).

15. *Holmes, A.D., Lindquist, H.G., Jones, C.P. and Wertz, A.W.*: Effect of high-temperature-short-time pasteurization on the ascorbic acid, riboflavin and thiamin content of milk. *J. Dairy Sci.* 28, 29–33 (1945).
16. *Theophilus, D.R. and Stamberg, O.E.*: The influence of breed, feed, and processing on the riboflavin content of milk. *J. Dairy Sci.* 28, 259–268 (1945).
17. *Chapman, H.R., Ford, J.E., Kon, S.Y., Thompson, S.Y., Rowland, S.J., Crossley, E.L. and Rothwell, J.*: Further studies of the effect of processing on some vitamins of the B complex in milk. *J. Dairy Res.* 24, 191–197 (1957).
18. *Ford, J.E., Kon, S.K. and Thompson, S.Y.*: Effects of processing on vitamins of the B-complex in milk. XV. Int. Dairy Congr. 1, 429–434 (1959).
19. *Nagasawa, T., Tanahashi, T., Kuzuya, Y. and Shigeta, N.*: Effect of ultrahigh-temperature treatment on some vitamins in milk. 2. Destruction of thiamine and riboflavin. *Jap. J. zootech. Sci.* 31, 200–203 (1960).
20. *Wodsak, W.*: Die Haltbarkeit der Vitamine der Milch beim Pasteurisieren, Sterilisieren und bei der Herstellung von Kondensmilch. *Nahrung* 4, 209–224 (1960).
21. *Blanc, B.*: Einfluss der thermischen Behandlung auf die wichtigsten Milchinhaltstoffe und auf den ernährungsphysiologischen Wert der Milch. *Alimenta Sonderausgabe* 5–25 (1980).
22. *Eitenmiller, R.R., Goldsmith, S.J., Barnhart, H.M. and Toledo, R.T.*: Effects of processing and storage on protective factors and water soluble vitamins in human milk. *Res. Food Sci. Nutr.* 3, 23–24 (1983).
23. *Goldsmith, S.J., Eitenmiller, R.R., Toledo, R.T. and Barnhart, H.M.*: Effects of processing and storage on the water-soluble vitamin content of human milk. *J. Food Sci.* 48, 994–995 (1983).
24. *Haddad, G.S. and Loewenstein, M.*: Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.* 66, 1601–1606 (1983).
25. *Ford, J.E., Schröder, M.J.A., Bland, M.A., Blease, K.S. and Scott, K.J.*: Keeping quality of milk on relation to the copper content and temperature of pasteurization. *J. Dairy Res.* 53, 391–406 (1986).
26. *Zoeren-Grobbe D. van, Schrijver, J., Berg H. van den and Berger, H.M.*: Human milk vitamin content after pasteurisation, storage, or tube feeding. *Arch. Dis. Childh.* 62, 161–165 (1987).
27. *Lavigne, C., Zee, J.A., Simard, R.E. and Béliveau, B.*: Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B₁, B₂, and C and on the shelf-life of goat's milk. *J. Food Sci.* 54, 30–34 (1989).
28. *Bernhard, K., Gschaedler, L. und Sarasin, A.*: Die biologische Wertigkeit der uperisierten (= ultrapasteurisierten) Milch. *Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.* 9, 312–324 (1953).
29. *Lhuissier, M., Hugot, D. et Biette, E.*: Etude vitaminologique du lait «uperisé». *Rev. Lait. Franc.* (194) 319–320 (1962).
30. *Lembke, A., Frahm, H. und Wegener, K.H.*: Ernährungsphysiologische Untersuchungen zur Ultrahocherhitzung der Milch. *Kieler Milchwirt. Forschungsber.* 20, 331–342 (1968).
31. *Ford, J.E., Porter, J.W.G., Thompson, S.Y., Toothill, J. and Edwards-Webb, J.*: Effect of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk. *J. Dairy Res.* 36, 447–454 (1969).
32. *Karlin, R.*: Sur la teneur en folates des laits de grand mélange. Effets de divers traitements thermiques sur les taux de folates, B₁₂ et B₆ de ces laits. *Int. Z. Vitaminforsch.* 39, 359–371 (1969).

33. *Rossikhina, G.A., Mastakov, N.N. and Seleznev, V.I.*: Moloch. Prom. 30, 21–22 (1969), zit. Dairy Sci. Abstr. 31, 532 (1969).
34. *Ferretti, L., Lelli, M.E., Miuccio, C. e Ragni, C.*: Variazioni quantitative di alcune vitamine nel latte U.H.T. durante la conservazione. Quad. Nutr. 30, 124–133 (1970).
35. *Thomas, E.L., Burton, H., Ford, J.E. and Perkin, A.G.*: The effect of oxygen content on flavour and chemical changes during aseptic storage of whole milk after ultra-high-temperature processing. J. Dairy Res. 42, 285–295 (1975).
36. *Horak, F.P.*: Über die Reaktionskinetik der Sporenbildung und chemischer Veränderungen bei der thermischen Haltbarmachung von Milch zur Optimierung von Erhitzungsverfahren. Diss. Techn. Univ. München 1–141, 1980.
37. *Blanc, B., Flückiger, E., Rüegg, M. und Steiger, G.*: Einfluss der Kühlung der Rohmilch mit und ohne Anreicherung psychrotropher Keime auf die Qualität von UHT-Milch. Alimenta 23, 53–60 (1984).
38. *Oamen, E.E., Hansen, A.P. and Swartzel, K.R.*: Effect of ultra-high temperature steam injection processing and aseptic storage on labile water-soluble vitamins in milk. J. Dairy Sci. 72, 614–619 (1989).
39. *Williams, R.R. and Cheldelin, V.H.*: Destruction of riboflavin in light. Science 96, 22–23 (1942).
40. *Stamberg, O.E. and Theophilus, D.R.*: Photolysis of riboflavin in milk. J. Dairy Sci. 28, 269–275 (1945).
41. *Mijll Dekker, L.P. van der and Engel, C.*: The vitamin A, B₁, B₂ and C contents of bottled sterilized milk during storage under various conditions. Neth. Milk Dairy J. 6, 104–108 (1952).
42. *Ford, J.E.*: The influence of the dissolved oxygen in milk on the stability of some vitamins towards heating and during subsequent exposure to sunlight. J. Dairy Sci. 34, 239–247 (1967).
43. *Sikka, P., Narayan, R. and Atheya, U.K.*: Effect of light and sterilization on milk riboflavin in cows and buffaloes. Indian J. Dairy Sci. 43, 598–600 (1990).
44. *Causeret, J., Hugot, D., Goulas-Scholler, C. et Mocquot, G.*: Evolution de la teneur du lait stérilisé en riboflavine et en vitamine A au cours d'une conservation de longue durée. Ann. Technol. agric. 10, 289–300 (1961).
45. *Hugot, D., Lhuissier, M. et Causeret, J.*: Effet protecteur des bouteilles de verre ambré contre les pertes de riboflavine et de vitamine A dues à l'exposition du lait stérilisé à la lumière. Ann. Technol. agric. 11 (2), 145–151 (1962).
46. *Hedrick, T.I. and Glass, L.*: Chemical changes in milk during exposure to fluorescent light. J. Milk Food Technol. 38, 129–131 (1975).
47. *Goussault, B., Gagnepain, M.F. et Luquet, F.M.*: Contribution à l'étude de quelques vitamines du lait pasteurisé en fonction du conditionnement et du mode de stockage. Rev. Lait. Franc. (361) 69–72 (1978).
48. *Görner, F. und Uherova, R.*: Vitaminveränderungen der H-Milch während der Lagerung. Nahrung 24, 373–379 (1980).
49. *Fanelli, A.J., Burlaw, J.V. and Gabriel, M.K.*: Protection of milk packaged in high density polyethylene against photodegradation by fluorescent light. J. Food Protect. 48, 112–117 (1985).
50. *Schröder, M.J.A., Scott, K.J., Bland, M.A. and Bishop, D.R.*: Flavour and vitamin stability in pasteurized milk in polyethylene-coated cartons and in polyethylene bottles. J. Soc. Dairy Technol. 38, 48–52 (1985).

51. *Kneifel, W. und Sommer, R.*: Zum lagerungsbedingten Abbau einiger wasserlöslicher Vitamine in Haltbarmilch. *Öst. Milchwirt.* 41 (WB10), 79–87 (1986).
52. *Mohammad, K.S., Al-Thalib, N.A. and Al-Kashab, L.A.*: Some water-soluble vitamins in different types of milk and their stabilities towards light and oxygen. *Egypt. J. Dairy Sci.* 18, 37–44 (1990).
53. *Dolfini, L., Kueni, R., Eberhard, P., Fuchs, D., Gallmann, P.U., Strahm, W. und Sieber, R.*: Über das Verhalten von zugesetzten Vitaminen während der Lagerung von UHT-Magermilch. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 82, 187–198 (1991).
54. *Tagliaferri, E.*: Effet protecteur de l'emballage contre la photo-oxydation. IV. Etude de la stabilité de vitamines A et B₂ dans divers yoghourts en cours de stockage. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* 80, 77–86 (1989).
55. *Sattar, A., deMan, J.M. and Alexander, J.C.*: Light-induced degradation of vitamins. I. Kinetic studies on riboflavin decomposition in solution. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 10, 61–64 (1977).
56. *Bekbölet, M.*: Light effects on food. *J. Food Protect.* 53, 430–440 (1990).
57. *NN*: Solar simulation for research & industry. Oriel, Stamford (o.J.).
58. *Bosset, J.O., Desarzens, C. et Blanc, B.*: La photodégradation du lait et de quelques produits laitiers. Partie II: Influence de certains facteurs chimiques et chimico-physiques sur l'altération de la seule couleur. *Lebensm.-Wiss. -Technol.* 17, 248–253 (1983).
59. *Bosset, J.O. und Flückiger, E.*: Einfluss der Licht- und Gasdurchlässigkeit verschiedener Packungsarten auf die Qualitätserhaltung von Naturjoghurt. *Deut. Milchw.* 37, 908–914 (1986).
60. *Ford, J.E., Gregory, M.E. and Thompson, S.Y.*: The effect of gamma irradiation on the vitamins and proteins of liquid milk. XVI. *Int. Milchw. Kongr. A*, 917–923 (1966).
61. *Peterson, W.J., Haig, F.M. and Shaw, A.O.*: Destruction of riboflavin in milk by sunlight. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 662–663 (1944).
62. *Ziegler, J.A.*: Photochemical destruction of vitamin B₂ in milk. *J. Am. Chem. Soc.* 66, 1039–1040 (1944).
63. *Holmes, A.D. and Jones, C.P.*: Effect of sunshine upon the ascorbic acid and riboflavin content of milk. *J. Nutr.* 29, 201–209 (1945).
64. *Josephson, D.V., Burgwald, L.H. and Stoltz, R.B.*: The effect of route delivery on the flavor, riboflavin, and ascorbic acid content of milk. *J. Dairy Sci.* 29, 273–284 (1946).
65. *Herreid, E.O., Ruskin, B., Clark, G. and Parks, T.B.*: Ascorbic acid and riboflavin destruction and flavor development in milk exposed to the sun in amber, clear paper and ruby bottles. *J. Dairy Sci.* 35, 772–778 (1952).
66. *Kon, S.K. and Thompson, S.Y.*: The effect of light on riboflavin in milk. XIII. *Int. Dairy Congr.* 2, 363–367 (1953).
67. *Funai, V.*: [Riboflavin in milk by sunlight]. *Shikoku Acta Med.* 9, 78–88 (1956).
68. *Somogyi, J.C. and Ott, E.*: Die Wirkung des Lichtes auf den Vitamingehalt der Milch. *Int. Z. Vitaminforsch.* 32, 493–498 (1962).
69. *Kiermeier, F. und Waiblinger, W.*: Einfluss des Lichtes, insbesondere von Leuchtstoffröhren, auf Vitamin C- und B₂-Gehalt von in Polyäthylen verpackter Milch. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch.* 141, 320–331 (1969).
70. *Dimick, P.S.*: Effect of fluorescent light on the flavor and selected nutrients of homogenized milk held in conventional containers. *J. Milk Food Technol.* 36, 383–387 (1973).
71. *Fukumoto, J. and Nakashima, K.*: [Protection of riboflavin in liquid milk from destruction by light using colour filters]. *J. Jap. Soc. Food Nutr.* 28, 257–261 (1975), zit. *Dairy Sci. Abstr.* 38, 791 (1976).

72. Paik, J.J. and Kim, H.: [Riboflavin in milk and milk products and the destructive effect of sunlight]. Korean J. Nutr. 9, 164–168 (1976), zit. Dairy Sci. Abstr. 39, 462 (1977).
73. Man, J.M.de: Possibilities of prevention of light-induced quality loss of milk. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 11, 152–154 (1978).
74. Hoskin, J.C. and Dimick, P.S.: Evaluation of fluorescent light on flavor and riboflavin content of milk held in gallon returnable containers. J. Food Protect. 42, 105–109 (1979).
75. Desarzens, C., Bosset, J.O. et Blanc, B.: La photodégradation du lait et de quelques produits laitiers. Partie I: Altérations de la couleur, du goût et de la teneur en quelques vitamines. Lebensm.-Wiss. -Technol. 17, 241–247 (1983).
76. Bates, C.J., Liu, D.-S., Fuller, N.J. and Lucas, A.: Susceptibility of riboflavin and vitamin A in breast milk to photodegradation and its implications for the use of banked breast milk in infant feeding. Acta Paed. Scand. 74, 40–44 (1985).
77. Gaylord, A.M., Warthesen, J.J. and Smith, D.E.: Influence of milk fat, milk solids, and light intensity on the light stability of vitamin A and riboflavin in lowfat milk. J. Dairy Sci. 69, 2779–2784 (1986).
78. Hoskin, J.C.: Effect of fluorescent light on flavor and riboflavin content of milk held in modified half-gallon containers. J. Food Protect. 51, 19–23 (1988).
79. Renner, E., Renz-Schauen, A. und Drathen, M.: Einfluss der Lichtintensität in Verkaufstheken auf die Qualität pasteurisierter Milch in unterschiedlichen Verpackungen. Deut. Mol. Ztg. 20, 609–612 (1988).
80. Singh, R.P., Heldman, D.R. and Kirk, J.R.: Kinetic analysis of light-induced riboflavin loss in whole milk. J. Food Protect. 40, 164–167 (1975).
81. Allen, C. and Parks, O.W.: Photodegradation of riboflavin in milks exposed to fluorescent light. J. Dairy Sci. 62, 1377–1379 (1979).
82. Toyosaki, T., Yamamoto, A. and Mineshita, T.: Effects of water content and light intensity on riboflavin photodegradation in dairy products. Milchwissenschaft 42, 364–367 (1987).
83. Nordlund, J.: On defects in milk induced by light. Finnish J. Dairy Sci. 42, 49–51 (1984).
84. Parks, O.W. and Allen, C.: Photodegradation of riboflavin to lumichrome in milk exposed to sunlight. J. Dairy Sci. 60, 1038–1041 (1977).
85. Toyosaki, T., Yamamoto, A. and Mineshita, T.: Kinetics of photolysis of milk riboflavin. Milchwissenschaft 43, 143–146 (1988).
86. Toyosaki, T. and Mineshita, T.: Antioxidant effect of riboflavin in aqueous solution. J. Agric. Food Chem. 37, 286–289 (1989).
87. Korycka-Dahl, M. and Richardson, T.: Photogeneration of superoxide anion in serum of bovine milk and in model systems containing riboflavin and amino acids. J. Dairy Sci. 61, 400–407 (1978).
88. Korycka-Dahl, M. and Richardson, T.: Photogeneration of superoxide anion upon illumination of bovine milk serum proteins with fluorescent light in the presence of riboflavin. J. Dairy Sci. 62, 183–188 (1979).
89. Aurand, L.W., Singleton, J.A. and Noble, B.W.: Photo-oxidation reactions in milk. J. Dairy Sci. 46, 1050–1053 (1963).
90. Toyosaki, T. and Mineshita, T.: Mechanism of milk riboflavin photolysis in model systems. Milchwissenschaft 44, 292–294 (1989).
91. Aurand, L.W., Singleton, J.A. and Matrone, G.: Sunlight flavor in milk. Part II: Complex formation between milk proteins and riboflavin. J. Dairy Sci. 47, 827–830 (1964).
92. Aurand, L.W., Boone, N.H. and Giddings, G.G.: Superoxide and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. J. Dairy Sci. 60, 363–369 (1977).

93. *Finley, J.W. and Shipe, W.F.*: Isolation of a flavor producing fraction from light exposed milk. *J. Dairy Sci.* **54**, 15–20 (1971).
94. *Korycka-Dahl, M. and Richardson, T.*: Initiation of oxidative changes in foods. *J. Dairy Sci.* **63**, 1181–1198 (1980).
95. *Toyosaki, T., Yamamoto, A. and Mineshita, T.*: Partial purification of an antioxidizing component in raw cow milk. *J. Food Sci.* **52**, 88–90 (1987).
96. *NN*: Polarographische Bestimmung von Riboflavin (Vitamin B₂). Application Bulletin 219/1, Metrohm, Herisau 1992.
97. *Demel, S., Steiner, I., Washüttl, J. und Kroyer, G.*: Chemische und mikrobiologische Untersuchungen an mikrowellenbehandelter Milch. *Z. Ernährungswiss.* **29**, 299–303 (1990).

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

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

C

C