

Ribonucleoside in Milch: Charakterisierung und Bestimmung des Konzentrationsprofils dieser minoren Komponenten über eine Laktationsperiode

Ribonucleosides in Milk: Characterization and Determination of the Concentration Profile of these Minor Components throughout a Lactation Period

Kurt-Peter Raezke und Eckhard Schlimme

Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für Milchforschung,
Hermann-Weigmann-Straße 1, D-2300 Kiel, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **45c**, 655–662 (1990); received February 23, 1990

Bovine Milk, Colostral Phase, Lactation Period, Minor Milk Constituents, Ribonucleosides

The ribonucleosides adenosine, cytidine, guanosine, inosine and uridine as well as the modified components N 1-methyladenosine and N 6-carbamoylthreonyladenosine were characterized and determined quantitatively as minor constituents in raw bovine milk by use of an automated high performance liquid chromatography system. The studies have shown that except for the colostral phase the ribonucleoside levels are constant throughout the whole lactation period. That means, there is a typical ribonucleoside pattern which is assumed to be species-specific.

Einleitung

In den vergangenen fünfzehn Jahren wurden Ribonucleoside als intrinsische Verbindungen in physiologischen Flüssigkeiten nachgewiesen und in einer Reihe von Arbeiten nach Konzentration und Muster charakterisiert [1–20]. Ribonucleoside werden als Produkte des zellulären RNA-Stoffwechsels in Körperflüssigkeiten wie Blut, Milch und Harn sezerniert. Im Gegensatz zu den reutilisierbaren unmodifizierten Ribonucleosiden werden die modifizierten Verbindungen renal eliminiert, so daß diese RNA-Katabolite durch nichtinvasive Methoden im Harn quantitativ analysiert werden können und Hinweise auf bestimmte Stoffwechselsituationen zulassen [6, 9, 12, 18, 20–29]. Auf die Bedeutung erhöhter Ausscheidungswerte dieser Substanzklasse im Harn beispielsweise für die Tumordiagnostik hatte schon frühzeitig Borek [24] hingewiesen. Die Harnkonzentrationen insbesondere der modifizierten und hypermodifizierten Ribonucleoside sind als tRNA-Katabolite nach Arbeiten von Schöch [9, 16, 28, 29] auch zur Messung der Ganzkörper-Stoffwechselaktivität geeignet.

Abkürzungen: HPLC, Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography); IP, isoelektrischer Punkt.

Sonderdruckanforderungen an E. Schlimme.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/90/0600–0655 \$ 01.30/0

Ribonucleoside wurden als minore Inhaltsstoffe ebenfalls in Milchen nachgewiesen [13–15, 18] mit einem offenbar für die jeweilige Tierart typischen Ribonucleosidmuster [15, 30, 31]. Die Bedeutung dieser Substanzklasse in Milchen unter biochemischen und ernährungsphysiologischen Aspekten ist ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wird erstmals in einer Longitudinaluntersuchung über eine gesamte Laktationsperiode über den Konzentrationsverlauf und das Verteilungsmuster von Adenosin, Cytidin, Guanosin, Inosin, N 1-Methyladenosin, N 6-Carbamoylthreonyladenosin und Uridin in boviner Milch berichtet.

Experimentelles

Apparative Aufbau und Wirkungsweise des Ribonucleosid-Analysators: Die Konfiguration des automatisierten Zweisäulen-Hochleistungsflüssigchromatographen wurde an anderer Stelle beschrieben [11, 12, 17, 20, 32–34]. Die Affinitätsvorsäule (40 × 4 mm ID) enthält ein mit chemisch modifizierter Phenylboronsäure immobilisiertes, chemisch und mechanisch stabiles Gel [33], dessen Wirkungsprinzip sich in einer fünfstufigen Schrittfolge beschreiben läßt:

1. Chemoselektive Bindung durch Ausbildung cyclischer Diester zwischen Ribonucleosiden und Boronsäureliganden unter schwach alkalischen Bedingungen (0,1 mol/l Diammoniumhydrogenphosphat, pH 9,8). Es erfolgt dadurch eine Auf-



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

konzentrierung der Ribonucleoside auf der Vorsäule.

2. Vollständige Elution der Milchmatrix von der Vorsäule aufgrund der Gelpermeationseigenschaften der Affinitätsphase.

3. Quantitative Ablösung der Ribonucleoside von der Vorsäule durch Herabsetzen des pH-Wertes der mobilen Phase auf 3,4, wodurch die cyclischen Diesterbindungen hydrolysiert und die Nucleoside von der Vorsäule auf die mit dieser „online“-gekoppelten analytischen Säule (125 × 4 mm ID; Superspher 100 RP 18e, 5 µm) transferiert werden.

4. Trennung der Ribonucleoside auf der analytischen Säule mit einem 0,03 mol/l Ammoniumformiat (pH 3,4)/Methanol-Gradienten und Detektion der UV-Absorption bei 260 nm.

5. Rekonditionierung der Vorsäule mit 0,1 mol/l Diammoniumhydrogenphosphat, pH 9,8, während der Trennung auf der analytischen Säule.

Abbildung 1 zeigt das Chromatogramm einer on-line-Analyse von 50 µl Rohmilch. Eine detail-

lierte Beschreibung des Ribonucleosid-Analysators und der Gradientenbedingungen für das duale HPLC-System im Analysen- und Waschprogramm erfolgte an anderer Stelle [17, 20, 34, 35].

Validierung des Ribonucleosid-Analysators: Wiederfindung (97–100%); Wiederholbarkeit (r [36, 37] für 20 Bestimmungen und 95% statistische Sicherheit) der matrixabhängigen Impräzision für laktophysiologische Nucleosidgehalte bis 25 µmol/l (3–7%); Wiederholbarkeit (r) der matrixabhängigen Impräzision für Retentionszeiten (0,2–1,8%); Abweichungen vom wahren Wert (Unrichtigkeit) im Bereich von 1–5 µmol/l (0,8–4,4%) bzw. von 5–84 µmol/l (0,5–8,8%); Linearität war im Konzentrationsbereich von 0,1–100 µmol/l (entsprechend 0,01–10 nmol Ribonucleosid pro Analyse) voll gegeben; Bestimmungsgrenze pro Analyse mit einer Detektion bei 260 nm lag bei 1,5 pmol (Uridin), 1,9 pmol (Cytidin), 2,1 pmol (N 1-Methyladenosin), 3,6 pmol (N 6-Carbamoylthreonyladenosin), 4,8 pmol (Adenosin), 4,9 pmol (Inosin) und 6,4 pmol (Guanosin) in 100 µl Aufgabevolumen.

Material: Die authentischen Ribonucleoside wurden von Sigma Chemie (München) bezogen. N 6-Carbamoylthreonyladenosin wurde gemäß [38] synthetisiert und durch ^1H - und ^{13}C -NMR, Massen- und UV-Spektroskopie sowie Elementaranalyse charakterisiert.

Für die Untersuchung wurden 8 Kühe der Rasse Deutsche Schwarzbunte gehalten. Das Grundfutter (Futterkonserven) wurde *ad libitum* vorgelegt; die Versorgung mit Kraftfutter wurde entsprechend der Milchleistung des Einzeltiers vorgenommen [19]. Die Messungen wurden in der Mitte einer Laktationsperiode begonnen und bis zur Mitte der folgenden Laktationsperiode ausgeführt. Die Ribonucleoside Adenosin (Ado), Cytidin (Cyd), Guanosin (Guo), Inosin (Ino) und Uridin (Urd) sowie die modifizierten Komponenten N 1-Methyladenosin (mlAdo) und N 6-Carbamoylthreonyladenosin (t6Ado) wurden an drei Tagen in der Woche (Montag, Mittwoch, Freitag) über einen Zeitraum von 446 Tagen in den Morgengemelken der Kühe quantitativ bestimmt.

Probenvorbereitung: Für die quantitative Analyse der Ribonucleoside wurde die Rohmilch zur Vermeidung postsekretorischer Veränderungen unmittelbar nach dem Melken mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 4,6 abgesenkt, wodurch

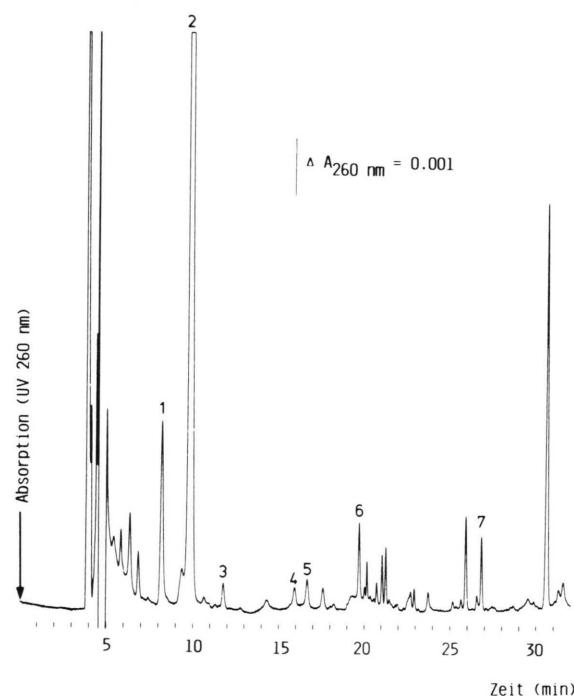


Abb. 1. Chromatogramm einer on-line-Analyse von 50 µl Rohmilch. 1 (Cytidin), 2 (Uridin), 3 (N 1-Methyladenosin), 4 (Inosin), 5 (Guanosin), 6 (Adenosin), 7 (N 6-Carbamoylthreonyladenosin).

eine Ausfällung der Caseine (IP bei 4,6) erfolgte. 1 ml wurden anschließend zentrifugiert (Tischzentrifuge Typ 5414S, Eppendorf-Gerätebau, Hamburg), der klare Überstand in Analysengefäße (Sternkopf, Lübeck) übergeführt und unmittelbar danach zur Analyse in den auf 4 °C temperierten Autosampler des Nucleosid-Analysators gestellt.

Strukturelle Zuordnung der Ribonucleoside: Die Zuordnung der einzelnen Peaks zur Substanzklasse der Ribonucleoside wurde durch oxidativen Perjodat-Abbau in der Milchprobe vor der HPLC-Analyse geprüft. Die Peaks der charakterisierten 7 Ribonucleoside traten im Chromatogramm nach Perjodatspaltung nicht mehr auf. Die spezielle Zuordnung jedes einzelnen Ribonucleosids erfolgte mit authentischen Substanzen durch den Nachweis des isochromatographischen Verhaltens und identischer UV-Eigenschaften (Absorptionsmaxima und -minima; Wellenlängenquotienten), die mit einem Photodiodearray-Detektor (Modell C 3000, Merck-Hitachi, Darmstadt) gemessen wurden. Zusätzlich konnten durch enzymatisch (Adenosindesaminase EC 3.5.4.4, Nucleosidphosphorylase EC 2.4.2.1, beide von Boehringer, Mannheim) sowie chemisch (Dimroth-Umlagerung von N 1-Methyladenosin in N 6-Methyladenosin) hervorgerufene Modifizierungen charakteristische Peak-Verschiebungen bzw. -Löschen in der HPLC-Analyse zur Identifizierung der Ribonucleoside genutzt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Es konnten folgende Ribonucleoside als minore Inhaltsstoffe boviner Milch nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden: Adenosin, Cytidin, Guanosin, Inosin, Uridin und die modifizierten Verbindungen N 1-Methyladenosin sowie N 6-Carbamoylthreonyladenosin. Die Untersuchungen haben gezeigt, daß die Ribonucleosidspiegel über die gesamte Laktationsperiode – mit Ausnahme der Kolostralphase – konstant sind, so daß von einem typischen Ribonucleosidmuster der bovinen Milch gesprochen werden kann, das – aufgrund von Analysen anderer Säugermilchen [15, 30, 31] und Messungen von Nucleotidgehalten in Kuh-, Schaf- und Ziegenmilchen [39] – offenbar tierartenspezifisch ist.

In Tabelle I sind die intraindividuellen Mittelwerte aller acht Tiere für eine gesamte Laktations-

periode ausschließlich der ersten drei Wochen *post partum* sowie der kleinste und größte Meßwert für das jeweilige Nucleosid aufgelistet. Die Messungen begannen, wie einleitend beschrieben, aus versuchstechnischen Gründen etwa in der Mitte einer Laktationsperiode und wurden bis zur Mitte der folgenden Periode fortgesetzt. Die Zusammenfassung beider Halbphasen zeigt eine sehr gute Überlappung der jeweiligen Nucleosidspiegel – wie beispielhaft dargestellt für die intraindividuellen Monatsmittelwerte eines Tieres (H019) für Uridin (Abb. 2 A) und N 6-Carbamoylthreonyladenosin (Abb. 2 B) – wie der majoren Milchinhaltstoffe (nicht gezeigt), so daß die Darstellung der Meßergebnisse in einer Laktationsperiode vorgenommen werden kann.

Die jeweiligen intraindividuellen Ribonucleosid-Mittelwerte der acht Tiere schwanken in einem engeren Bereich als die Meßwerte während der Laktationsperiode für jedes Einzeltier. Die intraindividuelle Streuung (Standardabweichung s vgl.

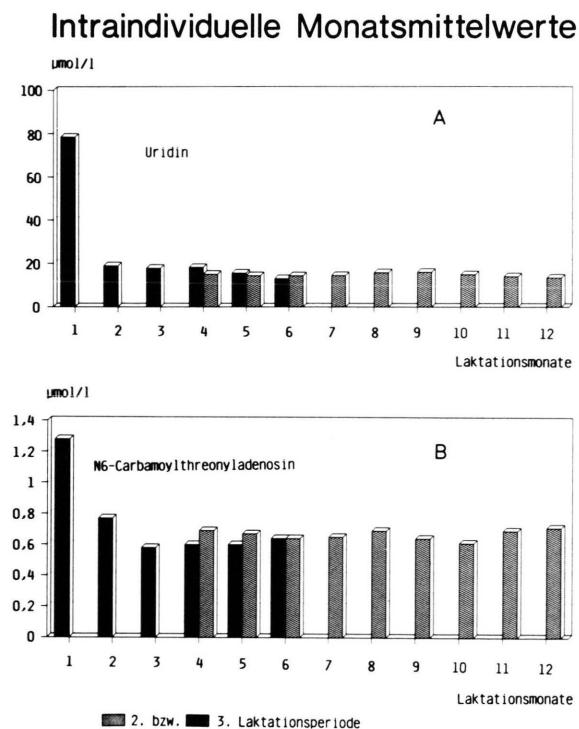


Abb. 2. Intraindividuelle Monatsmittelwerte eines Tieres (H019) für Uridin (A) und N 6-Carbamoylthreonyladenosin (B).

Tab. I. Intraindividuelle Ribonucleosid-Mittelwerte ($\mu\text{mol/l}$) für eine gesamte Laktationsperiode ausschließlich der ersten drei Wochen *post partum*.

Tier		Ado	Cyd	Guo	Ino	Urd	m1 Ado	t6 Ado	Ado + Ino
C 092	c ^a	1,98	2,49	0,71	0,83	15,43	0,42	0,78	2,81
	s ^b	0,61	0,94	0,31	0,28	5,21	0,06	0,10	0,61
	min ^c	0,58	0,71	0,15	0,26	9,71	0,29	0,51	1,01
	max ^c	3,50	5,77	2,22	1,54	43,32	0,64	1,03	4,39
C112	c	0,97	2,34	0,59	0,97	12,50	0,38	0,37	1,94
	s	0,39	0,53	0,20	0,32	2,96	0,06	0,09	0,49
	min	0,15	1,22	0,14	0,19	6,78	0,23	0,52	0,43
	max	2,01	3,51	1,48	1,98	21,62	0,60	1,02	2,85
E 111	c	1,77	2,44	1,02	1,38	19,20	0,45	0,66	3,14
	s	0,77	0,64	0,41	0,52	5,78	0,09	0,08	0,85
	min	0,25	0,76	0,22	0,25	6,15	0,33	0,50	0,50
	max	3,69	4,00	2,16	3,22	34,48	0,99	0,88	5,26
F 096	c	1,02	2,34	0,78	0,84	10,98	0,38	0,68	1,86
	s	0,44	0,98	0,27	0,33	3,76	0,07	0,13	0,75
	min	0,07	0,53	0,17	0,01	3,63	0,17	0,51	0,13
	max	2,03	4,88	1,64	1,55	25,16	0,61	1,16	3,55
F 103	c	1,06	2,31	0,74	0,97	14,33	0,40	0,73	2,03
	s	0,39	0,64	0,19	0,47	2,85	0,06	0,25	0,48
	min	0,09	1,06	0,19	0,21	3,94	0,24	0,40	0,43
	max	1,89	4,80	1,42	3,08	23,27	0,66	3,40	3,95
G 003	c	1,25	2,06	0,96	0,97	15,95	0,39	0,74	2,22
	s	0,47	0,63	0,35	0,34	3,04	0,06	0,10	0,58
	min	0,21	0,84	0,29	0,05	9,99	0,19	0,44	0,26
	max	2,09	5,07	2,17	1,89	24,75	0,62	1,21	3,78
H 019	c	1,80	2,89	0,96	0,75	15,66	0,44	0,66	2,55
	s	0,62	0,60	0,27	0,33	2,93	0,12	0,10	0,56
	min	0,06	1,61	0,18	0,15	10,12	0,30	0,46	0,21
	max	2,96	4,61	1,90	2,22	25,49	1,58	1,25	3,92
H 038	c	1,01	2,58	0,85	1,08	13,30	0,37	0,67	2,09
	s	0,53	0,50	0,28	0,41	3,23	0,06	0,09	0,53
	min	0,11	1,54	0,10	0,12	8,32	0,26	0,46	0,23
	max	2,62	4,07	1,81	2,81	24,26	0,55	0,88	3,62

^a Jeder Mittelwert ist das arithmetische Mittel aus 3 Einzelmeßwerten (Doppelbestimmung) je Woche über eine gesamte Laktationsperiode ausschließlich der ersten 3 Laktationswochen (zusammen je nach Tier zwischen 250 und 400 Tagen).

^b Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

^c Kleinster und größter Meßwert im Verlaufe der gesamten Laktationsperiode ausschließlich der ersten 3 Laktationswochen.

Tab. I) – nachfolgend ausgedrückt als relative Standardabweichung in % (diese wird neben einem im Abschnitt Experimentelles genannten Anteil an Impräzision von max. 7% wesentlich durch die biologische Streuung bestimmt) – liegt bei den nicht modifizierten Ribonucleosiden zwischen 19 und 53% und bei den modifizierten Verbindungen zwischen 11 und 34%, wobei sieben der acht Tiere eine intraindividuelle Streuung von nur 11–20% aufwiesen. Interessant ist dabei die Beobachtung,

dass die Streuung für die Summe aus Ado und Ino mit 22–31% deutlich niedriger ausfällt als für die beiden Einzelnucleoside. Dieser Befund spricht für einen funktionalen Zusammenhang zwischen Ado und Ino, der sehr wahrscheinlich in der postsekretorischen Aktivität des originären Milchenzyms Adenosindesaminase vor der Konservierung der Proben – auch wenn diese unmittelbar nach Abschluß des Melkens erfolgte – begründet ist. In Sammelmilch – insbesondere mit kolostralen An-

teilen – die erst etwa 1 h nach dem Melken angesäuert wurde, und in der somit postsekretorische enzymatische Umsetzungen besonders begünstigt waren, wurden insgesamt höhere Ribonucleosidgehalte gefunden.

Die intraindividuelle Streuung der majoren Milchinhaltstoffe beträgt für Fett 15–23%, Eiweiß 7–14%, Lactose 2–4% und Harnstoff 23–39%; sie entspricht Literaturbefunden und wird in anderem Zusammenhang abgehandelt [40].

In der Kolostralphase sind die Ribonucleosidgehalte in der Milch aller acht Tiere gegenüber dem mittleren Gehalt der übrigen Laktationsperiode stark erhöht (Tab. II). Diese Aussage gilt nicht nur für das eigentliche Kolostrum während der beiden ersten Tage *post partum*. Die Ribonucleosidspiegel fallen erst nach etwa einem Laktationsmonat auf die „normalen“ Nucleosidkonzentrationen ab, die für die übrige Laktationsperiode typisch sind (Tab. I). Die modifizierten Nucleoside m1Ado und t6Ado weisen diese deutliche Laktationsabhängigkeit nur in der ersten Laktationswoche auf. Die sehr hohen Ribonucleosidkonzentrationen in der Kolostralmilch – vor allem von Uridin – werfen die Frage nach der laktophysiologischen Ursache für diesen Befund auf. Die Nucleoside können einmal über die Blut-Milch-Schranke [41–43] aus dem Blut in die Milch transferiert, zum anderen von der laktierenden Zelle in das Alveolarlumen sezerniert oder durch postsekretorische Stoffwechselvorgänge in der Milch (Milchenzyme, somatische Zellen, Keime) gebildet werden. Sehr wahrscheinlich ist neben der hohen Stoffwechselaktivität der Milchdrüse vor allem die erhöhte Transferrate der im Blut zirkulierenden Nucleosi-

de durch die Blut-Milch-Schranke in den ersten Tagen *post partum* zu diskutieren, in denen das Kolostrum einen großen Anteil von Blutbestandteilen enthält [42].

In Tabelle III sind die interindividuellen Mittelwerte der sieben quantifizierten Ribonucleoside zusammengefaßt. Die Ribonucleosid-Mittelwerte wurden für vier zeitliche Abschnitte der Laktationsperiode bestimmt. Die Wochenmittelwerte der ersten drei Laktationswochen zeigen einen deutlichen Abfall der Nucleosidspiegel im ersten Laktationsmonat. Lediglich Adenosin weist in der zweiten Laktationswoche einen gegenüber der ersten Woche höheren Konzentrationsmittelwert auf (Tab. III).

Die Ergebnisse dieser Longitudinaluntersuchung an einer kleinen Herde von acht Tieren haben gezeigt, daß – mit Ausnahme der Kolostralphase – die Ribonucleosidspiegel über die gesamte Laktationsperiode weitgehend konstant sind, so daß von einem typischen Ribonucleosidmuster der bovinen Milch gesprochen werden kann, das aufgrund von Analysen anderer Säugermilchen [15, 30, 31, 39] offenbar tierartenspezifisch ist.

Die Abbildung 3 zeigt die interindividuellen Konzentrationsprofile der sieben quantifizierten Verbindungen Adenosin, Cytidin, Guanosin, Inosin, Uridin, Adenosin + Inosin, N 1-Methyladenosin und N 6-Carbamoylthreonyladenosin über die gesamte Laktationsperiode einschließlich der Kolostralphase.

Aus der graphischen Darstellung aller Meßwerte für das jeweilige Ribonucleosid geht hervor, daß der Nucleosidspiegel während der Kolostralphase

Tab. II. Intraindividuelle Ribonucleosid-Mittelwerte^a ($\mu\text{mol/l}$) für die erste Laktationswoche *post partum*.

Tier	Ado	Cyd	Guo	Ino	Urd	m1Ado	t6Ado	Ado + Ino
C 092	2,25	5,82	2,48	4,49	128,35	0,65	3,75	6,74
C 112	1,89	17,53	2,16	4,75	168,89	1,27	4,52	6,64
E 111	1,86	5,59	1,19	4,89	103,83	0,76	2,30	6,75
F 096	2,16	8,01	2,23	4,68	107,62	2,23	3,25	6,84
F 103	1,03	11,33	3,35	6,61	146,07	0,62	3,59	7,99
G 003	3,05	16,64	1,58	4,49	67,67	0,59	1,39	7,54
H 019	2,16	17,01	2,24	4,53	198,84	1,20	2,54	6,69
H 038	1,54	13,28	1,71	3,47	131,21	0,42	1,57	5,00

^a Jeder Mittelwert ist das arithmetische Mittel aus Einzelmeßwerten (jeweils Doppelbestimmung) von drei Meßtagen aus der ersten Laktationswoche.

Tab. III. Interindividuelle Ribonucleosid-Mittelwerte ($\mu\text{mol/l}$).

	Ado	Cyd	Guo	Ino	Urd	m1 Ado	t6 Ado	Ado + Ino
c ₇ ^a	1,98	11,61	2,13	4,70	132,60	1,00	2,89	6,68
c ₁₄	2,61	6,02	1,96	2,94	58,22	0,53	1,06	5,55
c ₂₁	2,38	3,99	1,47	1,52	25,58	0,49	0,79	3,90
c ^b	1,36	2,44	0,82	0,97	14,69	0,40	0,71	2,33
s ^c	0,67	0,78	0,32	0,42	4,73	0,08	0,14	0,74
min ^d	0,06	0,53	0,10	0,01	3,63	0,17	0,40	0,13
max ^d	3,93	10,76	2,22	3,25	68,22	1,58	3,40	7,18

^a Jeder Mittelwert ist das arithmetische Mittel aus Einzelmeßwerten (jeweils Doppelbestimmung) von drei Meßtagen je Laktationswoche aller 8 Tiere; c₇: für die erste Laktationswoche; c₁₄: für die zweite Laktationswoche; c₂₁: für die dritte Laktationswoche.

^b Jeder Mittelwert ist das arithmetische Mittel auf 3 Einzelmeßwerten (jeweils Doppelbestimmung) je Woche aller 8 Tiere über eine gesamte Laktationsperiode ausschließlich der ersten 3 Laktationswochen *post partum*.

^c Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

^d Kleinster und größter Meßwert im Verlaufe der gesamten Laktationsperiode ausschließlich der ersten 3 Laktationswochen.

– wie bereits bei der Darstellung der intraindividuellen Ergebnisse diskutiert wurde – abnimmt und nach etwa drei bis vier Wochen *post partum* ein Konzentrationsniveau in der Milch erreicht, das über die gesamte Laktationszeit weitgehend konstant bleibt.

In diesem Zusammenhang soll kurz darauf hingewiesen werden, daß während der ersten beiden Wochen *post partum* die Triglyceridzusammensetzung des Milchfettes stark von der reifer Milch abweicht. Mit Hilfe bestimmter Triglyceridkombinationen dieses Kolostralmilchfettes ist es möglich, einige Ribonucleosidgehalte der Kolostralmilch theoretisch zu berechnen [44].

Die interindividuelle Streuung – nachfolgend ausgedrückt als relative Standardabweichung in % (Standardabweichung s vgl. Tab. III) – wird neben dem im Abschnitt Experimentelles genannten Anteil an Impräzision von max. 7% insbesondere durch die biologische Streuung bestimmt und ist – wie bereits bei der intraindividuellen Streuung diskutiert – bei den beiden modifizierten Ribonucleosiden deutlich kleiner als bei den unmodifizierten Verbindungen. Die relative Standardabweichung beträgt für m1 Ado bzw. t6 Ado etwa 19%

und für Cyd, Guo, Ino und Urd etwa 32%. Für Ado bzw. Ino allein liegt die relative Standardabweichung bei 49 bzw. 44%; für die Summe beider Ribonucleoside ebenfalls bei 32%. Der Grund für diesen funktionalen Zusammenhang ist – wie bereits diskutiert – in der postsekretorischen Aktivität des Milchenzyms Adenosindesaminase zu sehen.

Beim Vergleich der interindividuellen Ribonucleosidspiegel in der Rohmilch außerhalb der Kolostralphase fällt der etwa fünfzehnmal höhere Gehalt der Pyrimidinnucleoside Cyd und Urd mit etwa 17 $\mu\text{mol/l}$ gegenüber den Purinnucleosiden Ado, Guo und Ino mit etwa 3 $\mu\text{mol/l}$ auf. Eine laktophysiologische Erklärung vor allem für den hohen Gehalt an Urd von etwa 15 $\mu\text{mol/l}$ ist insbesondere in der Bedeutung von Uridinphosphaten für die Aktivierung von Hexosen im Verlauf der Laktose-Biosynthese der Milchdrüse zu sehen. So konnten von Gil und Sanchez-Medina [39] vor allem während der Kolostralphase sehr hohe Gehalte (bis zu 0,3 mmol/l) an UDP-Glucose und UDP-Galactose nachgewiesen werden, so daß der zehnfach erhöhte Uridinspiegel (~0,1 mmol/l, Tab. 3) während der ersten Laktationswoche nicht überrascht.

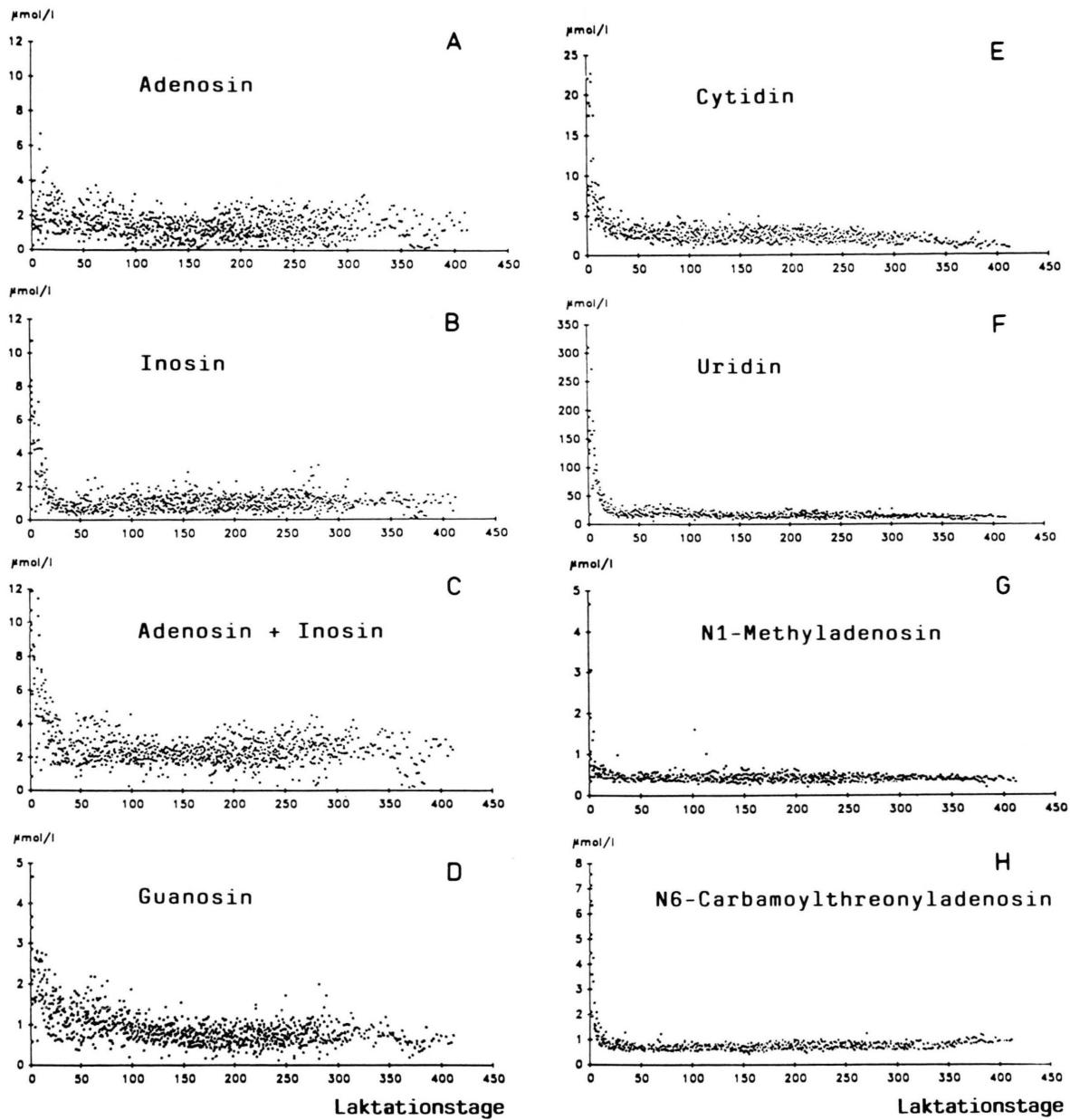


Abb. 3. Interindividuelle Konzentrationsprofile der sieben quantifizierten Ribonucleoside.

- [1] G. B. Chheda, *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology: Nucleic Acids* (G. Fasman, ed.), 251–270, CRC Press, Boca Raton 1975.
- [2] M. Uziel, L. H. Smith und S. A. Taylor, *Clin. Chem.* **22**, 1451–1455 (1976).
- [3] G. E. Davis, R. D. Suits, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, T. P. Waalkes und E. Borek, *Clin. Chem.* **23**, 1427–1435 (1977).
- [4] C. W. Gehrke, K. C. Kuo, G. E. Davis, R. D. Suits, T. P. Waalkes und E. Borek, *J. Chromatogr.* **150**, 455–476 (1978).
- [5] R. A. Hartwick, A. M. Krstulovic und P. R. Brown, *J. Chromatogr.* **186**, 659–676 (1979).
- [6] C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt und K. C. Kuo, *Clinical Liquid Chromatography* (P. M. Kabra, ed.), **Vol. 2**, 139–154, CRC Press, Boca Raton 1984.
- [7] E. Schlimme, K.-S. Boos und M. Weise, *Clin. Chem. Clin. Biochem.* **19**, 55–60 (1981).
- [8] E. Hagemeier, K. Kemper, K.-S. Boos und E. Schlimme, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **22**, 175–184 (1984).
- [9] G. Sander, J. Wieland, H. Topp, G. Heller-Schöch, N. Erb und G. Schöch, *Clin. Chim. Acta* **152**, 355–361 (1985).
- [10] M. Savoia, T. Russo, E. Rippa, L. Bucci, F. Mazzeo, F. Cimino und F. Salvatore, *J. Tumor Marker Oncol.* **1**, 61–68 (1986).
- [11] E. Hagemeier, K.-S. Boos, K. Kemper und E. Schlimme, *Handbook of Chromatography, Nucleic Acid and Related Compounds* (A. Krstulovic, ed.), 105–118, CRC Press, Boca Raton 1987.
- [12] E. Schlimme, K.-S. Boos, E. Hagemeier, K. Kemper, U. Meyer, H. Hobler, T. Schnelle und M. Weise, *J. Chromatogr.* **378**, 349–360 (1986).
- [13] W. Tiemeyer, H. Erbersdobler und D. Giesecke, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **173**, 301–305 (1981).
- [14] W. Tiemeyer, M. Stohrer und D. Giesecke, *J. Dairy Sci.* **67**, 723–728 (1984).
- [15] E. Schlimme, K.-S. Boos, H. Frister, K. Pabst, K.-P. Raezeke und B. Wilmers, *Milchwissenschaft* **41**, 757–762 (1986).
- [16] G. Schöch, G. Sander, H. Topp und G. Heller-Schöch, *Monatsschr. Kinderheilkd.* **134**, 647 (1986).
- [17] K.-S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey und E. Schlimme, *J. Chromatogr.* **456**, 93–104 (1988).
- [18] C. W. Gehrke und K. C. Kuo, *J. Chromatogr.* **471**, 3–36 (1989).
- [19] K.-P. Raezeke, H. Frister, K. Pabst und E. Schlimme, *Milchwissenschaft* **43**, 294–298 (1988).
- [20] E. Schlimme und K.-S. Boos, *Modified Nucleosides in Cancer and Normal Metabolism* (C. W. Gehrke, K. C. Kuo, eds.), *Journal of Chromatography Library*, **Vol. 45C**, C115–C145, Elsevier Publ., Amsterdam 1990.
- [21] J. Thomale und G. Nass, *Cancer Lett.* **15**, 149–152 (1982).
- [22] J. Thomale, A. Lutz und G. Nass, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **108**, 302–307 (1984).
- [23] G. Nass (ed.), *Modified Nucleosides and Cancer*, 432 S., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983.
- [24] E. Borek, O. K. Sharma und T. P. Waalkes, *Modified Nucleosides and Cancer* (G. Nass, ed.), 301–316, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983.
- [25] J. Speer, C. W. Gehrke, K. C. Kuo, T. P. Waalkes und E. Borek, *Cancer* **44**, 2120–2133 (1979).
- [26] F. Cimino, G. D. Birkmayer, E. Pimentel, J. V. Klaivins und F. Salvatore (eds.), *Prod. 3rd. Internat. Conf. on Human Tumor Markers*, 922 S., W. de Gruyter Verlag, Berlin 1987.
- [27] E. Schlimme, K.-S. Boos, H. Frister, H.-J. Gent, K.-P. Raezeke, E. Schwarzenau und B. Wilmers, *Progress in Cancer Research and Therapy* (F. Bresciani, R. F. B. King, M. E. Lippman und J. P. Raynoud, eds.), **Vol. 35**, 426–429, Raven Press, New York 1988.
- [28] G. Sander, J. Hülsemann, H. Topp, G. Heller-Schöch und G. Schöch, *Ann. Nutr. Metab.* **30**, 137–142 (1986).
- [29] G. Schöch, G. Sander, G. Heller-Schöch, H. Topp und B. Telaar, *Protein in der Säuglingsernährung* (F. Haschke, ed.), 26–39, Ferd. Enke Verlag, Stuttgart 1988.
- [30] K.-P. Raezeke, Naturwissenschaftliche Dissertation, Universität Paderborn 1988.
- [31] E. Schlimme, K.-P. Raezeke und F.-G. Ott, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [32] K.-S. Boos, B. Wilmers und E. Schlimme, *Königsteiner Chromatographie Tage* (H. Aigner, ed.), 219–228, Bad Soden, Waters Millipore GmbH, Eschborn, Germany 1985.
- [33] K.-S. Boos, B. Wilmers, R. Sauerbrey und E. Schlimme, Deutsches Patent P 3617805.5 (1986).
- [34] K.-P. Raezeke, K.-S. Boos, B. Wilmers und E. Schlimme, *Milchwissenschaft* **43**, 224–229 (1988).
- [35] K.-P. Raezeke, B. Wilmers, K.-S. Boos und E. Schlimme, *Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber.* **40**, 53–62 (1988).
- [36] DIN, ISO-Norm 5725 (1981).
- [37] K. Doerffel, *Statistik in der Analytischen Chemie*, VCH Verlag, Weinheim 1987.
- [38] G. B. Chheda und C. I. Hong, *J. Med. Chem.* **14**, 748–753 (1971).
- [39] A. Gil und F. Sanchez-Medina, *J. Dairy Res.* **48**, 35–44 (1981).
- [40] E. Schlimme, K.-P. Raezeke, K. Pabst und H. Frister, *Kieler Milchwirtsch. Forsch. Ber.* **42**, (1990) eingereicht.
- [41] G. Ziv und F. G. Sulman, *J. Dairy Sci.* **58**, 1637–1644 (1975).
- [42] B. L. Larson, H. L. Heary jr. und J. E. Devery, *J. Dairy Sci.* **63**, 665–671 (1980).
- [43] G. Ziv und J. E. Heavner, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **7**, 55–59 (1984).
- [44] E. Frede, D. Precht, K.-P. Raezeke und E. Schlimme, unveröffentlichte Ergebnisse.