

## 5. Kapitel

# Liquidchromatographische Analyse der Dimroth-Umlagerung des 1-Methyladenosins in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Hoherhitzung, der Pasteurisierung (Kurz- und Langzeiterhitzung) und der Thermisierung

D. Martin, C. Kiesner und E. Schlimme

### 1. Einleitung

Ribonucleoside treten als Abbauprodukte des zellulären Nucleinsäurenstoffwechsels mit einem artentypischen und damit artendifferenzierbaren Muster als minore Inhaltsstoffe der Milch auf (1-8). In den Milchen des Menschen sowie der Kuh, des Schafes und der Ziege wurden die Pyrimidinnucleoside Cytidin und Uridin, die Purinnucleoside Inosin, Guanosin und Adenosin sowie die modifizierten Purinnucleoside 1-Methyladenosin und N6-Carbamoyl-L-threonyladenosin nachgewiesen (3-8). Mit Ausnahme der Kolostralphase liegt in reifer boviner Sammelmilch der Spiegel an 1-Methyladenosin stabil um 0,40  $\mu\text{mol/l}$ . Durch eine thermisch induzierte Dimroth-Umlagerung wird aus 1-Methyladenosin das nicht in Rohmilch vorliegende N6-Methyladenosin gebildet (9-12\*). Aufgrund dieser Gegebenheiten ist N6-Methyladenosin im Grundsatz ein geeigneter chemischer Prozeßparameter zur Untersuchung der Wärmebelastung von Milch. Ein Ziel dieses Projektes war die Erarbeitung des Erhitzungsbereiches von Milch, für den N6-Methyladenosin als chemischer Prozeßparameter geeignet ist.

Im vorliegenden Kapitel wird über Untersuchungen der Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin in Milchen des Hoherhitzungs-(HE), des Pasteurisierungs- und des Thermisierungsbereichs (PT) berichtet, wobei zur Ermittlung der Konzentrationsprofile der methylierten Adenosine die HPLC-Analytik eingesetzt wurde.

### 2. Material und Methoden

#### 2.1 Herstellung der HE- und der PT- Milchproben

##### 2.1.1 Herstellung der HE-Milchproben

Für die Herstellung der Milchproben im Hoherhitzungsbereich (HE) wurde Sammelmilch (etwa 35 Tiere) der Versuchsstation Schaedtбек der Bundesanstalt für Milchforschung verwendet. Zur Einstellung des Fettgehaltes wurde Rohmilch auf 40 °C erwärmt und mittels einer Tellerzentrifuge (Westfalia-Separator, Oelde) separiert. Anschließend wurde die auf 3,5 % Fettgehalt eingestellte Milch bei ca. 70 °C homogenisiert und danach einer Versuchsanlage zur indirekten, kontinuierlichen Erhitzung von Milchen zugeführt. Die Erwärmung der Milch auf eine defi-

---

\* vgl. diesen Bericht (6. Kapitel)

nierte Temperatur erfolgt in dieser Anlage über einen Spiralrohrerwärmer. Durch den Einbau unterschiedlicher Heißhaltemodule und durch Variation der Heißhaltetemperaturen wurden Milchproben erzeugt, die unterschiedlichen Temperatur-Zeit-Kombinationen der Hoherhitzung unterworfen waren (13). Nach Beendigung der jeweiligen Hoherhitzungsversuche wurden die erhaltenen Versuchsmilchen auf +5 °C gekühlt.

### **2.1.2 Herstellung der PT-Milchproben**

Die Milchproben des Pasteurierungs(Kurz- und Langzeiterhitzungs)- und Thermisierungsbereichs (PT) wurden aus Rohmilch (Sammelmilch von 30 Tieren; aus dem Morgengemelk, Fettgehalt: 3,3 %) der Versuchsstation Schaedtbeek der Bundesanstalt für Milchforschung hergestellt. Zur Wärmebehandlung wurde die in 2.1.1 beschriebene Anlage zur kontinuierlichen Erhitzung von Milchen unter Verwendung der für den Pasteurierungs- und Thermisierungsbereich molkereiüblichen Temperatur-Zeit-Kombinationen genutzt. Nach Beendigung der Erhitzungsversuche wurden die erhaltenen Versuchsmilchen auf +5 °C abgekühlt.

### **2.1.3 Vorbereitung der Milchproben für die Ribonucleosidanalyse**

Zur Probenvorbereitung für die Ribonucleosidanalyse wurden die thermisch behandelten Milchproben mit konzentrierter Ameisensäure (Merck, Darmstadt) auf pH 3.5 angesäuert, zentrifugiert und die erhaltenen Seren durch Membranfiltration (0,2 µm Porengröße) für die liquidchromatographischen Analysen gereinigt. Die erhaltenen Seren wurden bis zur Analyse bei -21 °C gelagert.

## **2.2 Nachweis der Ribonucleoside in HE- und PT-Milchproben**

Der qualitative und quantitative Nachweis von Ribonucleosiden erfolgte mittels eines Zweisäulen-HPLC-Analysators (14-18); hierbei wird mit Hilfe eines mit Aminophenylboronsäure funktionalisierten Vorsäulengels eine chemoselektive Bindung von Ribonucleosiden und damit eine direkte Analyse aus biologischen Flüssigkeiten, so auch aus den HE- bzw. PT-Milchseren, erzielt (14,15). Die anschließende liquidchromatographische Trennung wird mittels einer Umkehrphasen-HPLC-Säule in automatisierter Konfiguration ausgeführt.

1-Methyladenosin (m1Ado) und N6-Methyladenosin (m6Ado) sowie Cytidin (Cyd), Uridin (Urd), Inosin (Ino), Guanosin (Guo) und Adenosin wurden von Sigma Chemie, Deisenhofen, bezogen. Das hypermodifizierte Ribonucleosid N6-Carbamoyl-L-threonyladenosin (L-t6Ado) wurde im Institut für Chemie und Physik der Bundesanstalt für Milchforschung gemäß (19,20) synthetisiert. Die quantitative Bestimmung der Nucleoside erfolgte mittels der externen Standard-Methode (14). Zur Detektion wurden ein UV-Detektor (UV-Detektor 655A-22, Merck-Hitachi, Darmstadt) und ein Photodiodenarray-Detektor (Modell 994, Waters-Millipore, Eschborn) verwendet. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze von m6Ado (2 pmol/Analyse bzw. 4) pmol/Analyse, bei einem Aufgabevolumen von 100 µl Milchserum) wurde im Rahmen dieser Arbeit revalidiert.

### 2.3 Abschätzung reaktionskinetischer und prozeßtechnischer Parameter im Bereich der Hoherhitzung (HE)

Die Bestimmung der Reaktionsordnung der Dimroth-Umlagerung von m1Ado zu m6Ado erfolgte durch Auftragen von  $\log (c_{A0} - c_{Bt})$  ( $c_{A0}$  = Ausgangskonzentration an m1Ado, Heißhaltezeit  $\tau = 0$  s;  $c_{Bt}$  = Konzentration an m6Ado nach einer bestimmten Heißhaltezeit  $\tau$ ) über die entsprechende äquivalente Heißhaltezeit  $\tau$  (s). Aus der Steigung der resultierenden Geraden wurden gemäß (21) die jeweilige Geschwindigkeitskonstante  $k$  und die Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  berechnet. Die Berechnung der Dezimalreduktionswerte (D-Wert) (22) erfolgte gemäß der Gleichung  $D = 2,303/k$ .

## 3. Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Thermisch induzierte Umlagerung des originären Ribonucleosids m1Ado zu m6Ado

Die Umlagerung von 1-Methyladenin zum N6-Methyladenin wurde bereits 1960 von Brookes und Lawley (23) unter alkalischen Bedingungen mit Hilfe der UV-Spektroskopie untersucht. Die Instabilität von methylierten Purinen wurde einige Jahre vorher von Elion, Leese und Timmis (24) beschrieben. Im Jahre 1968 zeigten Macon und Wolfenden (25), daß die hier vorliegende Dimroth-Umlagerung sowohl in neutraler als auch in alkalischer Lösung bei Raumtemperatur abläuft (Abb. 1). Bis zu einem pH-Wert von 8 findet die Umlagerung am protonierten 1-Methyladenosin statt, wobei die Reaktionsgeschwindigkeit der Konzentration der Hydroxidionen im Reaktionsansatz proportional ist. Die Ringöffnung stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Nach Drehung der C-C-Einfachbindung zwischen Position 5 und 6 des Puringerüsts kommt es zu einem nucleophilen Angriff der primären Aminogruppe am Kohlenstoffatom in Position 2 und damit zur Recyclisierung. Das „methylierte Stickstoffatom“ steht nun in 6-Position.

Die Bildung von m6Ado in thermisch behandelten Milchen wurde erstmals von Ott und Schlimme nachgewiesen (9). Die liquidchromatographische Analyse der Ribonucleoside m1Ado und m6Ado von Milchen aus dem Ultrahoherhitzungsbereich und die daraus berechneten reaktionskinetischen Parameter (z-Wert = 30,5 °C;  $Q_{10}$ -Wert = 2,13) bewiesen, daß die Dimroth-Umlagerung unter UHT-Erhitzungsbedingungen nach einer Reaktion 1. Ordnung abläuft (10,11). Bei Untersuchungen von wärmebehandelten Milchen des ausgedehnten Sterilbereichs konnte gezeigt werden, daß die Umlagerung auch in diesem Bereich einer Reaktionskinetik 1. Ordnung unterliegt und aus den Analysendaten bis zu einem  $F_0$ -Wert von 22 min reaktionskinetische und verfahrensschemische Parameter (D-Werte, z-Wert = 22,9 °C,  $Q_{10}$ -Wert = 2,73) berechnet werden können. Die erhaltenen Parameter stimmen mit den aus dem UHT-Bereich generierten Daten gut überein (12), so daß m6Ado als Hitzeindikator zur Charakterisierung des oberen UHT-Bereichs und des praxisrelevanten Sterilbereichs (bis zu  $F_0$ -Werten von 9 bis 15 min) angesehen werden kann.

### 3.2 Thermisch induzierte Bildung von N6-Methyladenosin in Milchen des Hoherhitzungsbereichs

In den auf 3,5 % Fettgehalt eingestellten und homogenisierten Ausgangsmilchen wurden N6-Methyladenosin-Gehalte zwischen 0,004 und 0,010  $\mu\text{mol/l}$  nachgewiesen, d.h. während der Thermisierung beim Separieren und Homogenisieren wurde unter den genannten Bedingungen m6Ado durch thermische Induktion gebildet. Die in den Versuchsmilchen im Hoherhitzungsbereich ermittelten m6Ado-Gehalte wurden um den jeweiligen m6Ado-Betrag in der Ausgangsmilch korrigiert.

Bei den Erhitzungsversuchen im HE-Bereich mit Prozeßtemperaturen zwischen 86 °C und 125 °C und äquivalenten Heißhaltezeiten zwischen 5,3 s und 62,4 s konnten mit zunehmender Wärmebelastung der Milch ansteigende Gehalte des Umlagerungsproduktes m6Ado nachgewiesen werden. Die Dimroth-Umlagerung des m1Ado in m6Ado ist somit auch bei diesen, im Vergleich zum Steril- bzw. UHT-Bereich, „mild“ erwärmten Milchen nachzuweisen. Die tatsächlich gemessenen Gehalte des Umlagerungsproduktes (Tab.1) liegen größtenteils jedoch unterhalb der Nachweisgrenze (2,0 pmol/Analyse = 0,02  $\mu\text{mol/l}$ ), so daß bei den HE-Versuchsmilchen aus analytischer Sicht die untere Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenze, die eine qualitative bzw. quantitative Auswertung der gebildeten m6Ado-Gehalte erlaubt, teilweise erreicht bzw. schon unterschritten wurde.

Daher wurden neben den m1Ado-Gehalten der Ausgangsmilch auch die liquid-chromatographisch bestimmten Gehalte dieses Nucleosids in den erhitzten Milchen aufgelistet. Durch Differenzbildung (Tab.1: (d)) wurden m1Ado-Konzentrationen errechnet, die mit dem tatsächlichen Gehalt an gebildetem m6Ado übereinstimmen sollten, da bei den angewendeten Temperatur-Zeit-Kombinationen die Dimroth-Umlagerung von keiner Nebenreaktion begleitet wird. Bei dieser Aussage muß jedoch bedacht werden, daß die Integration der m1Ado-Peakflächen in wärmebehandelten Milchen durch einen nicht basisliniengetrennten Nachbarpeak beeinträchtigt wird, so daß die aufgeführten Werte nur einen orientierenden Charakter besitzen.

#### 3.2.1 Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten, der Halbwertszeiten und der Dezimalreduktionswerte

Da bei den HE-Milchproben trotz der geringen Konzentrationen an Umlagerungsprodukt mit zunehmender Wärmebelastung ein Anstieg der Gehalte an m6Ado nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob die erhaltenen analytischen Ergebnisse ausreichen, um die reaktionskinetischen Parameter Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$ , Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  und Dezimalreduktionswert  $D$  berechnen zu können (Tab. 2).

Durch Auftragen des dekadischen Logarithmus der Konzentration an nicht umgelagertem m1Ado über die entsprechende äquivalente Heißhaltezeit wurde mit Hilfe der linearen Regression die jeweilige temperaturabhängige Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  berechnet. Die Korrelationskoeffizienten  $r$  der Regressionsgeraden liegen im Bereich von -0,8745 (86 °) bis -0,9886 (105 °C), so daß

im Temperaturbereich 86 °C bis 125 °C eine Kinetik 1. Ordnung für den Abbau von m1Ado angenommen werden darf. Mit zunehmender Heißhaltetemperatur steigen die Werte für die Geschwindigkeitskonstanten  $k$ , die Halbwertszeiten werden entsprechend kleiner, ebenso die Dezimalreduktionswerte. Auffallend sind jedoch die relativ großen Werte für  $k$  im Temperaturbereich 86 °C bis 115 °C im Vergleich mit den im Sterilbereich gefundenen Werten (12). So wurde bei den Sterilmilchproben bei 110 °C Prozeßtemperatur für  $k = 3,795 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  errechnet, bei 114 °C  $k = 6,049 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  (vgl. HE-Proben 4.1 - 4.4:  $k = 1,9625 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), d.h. bei den HE-Proben wurde eine Reaktionsgeschwindigkeitskonstante der Dimroth-Umlagerung bestimmt, die um ca. Faktor 3 größer ist. Mit zunehmender Prozeßtemperatur gleichen sich die Geschwindigkeitskonstanten in den verschiedenen Erhitzungsbereichen an. Im Gegensatz zu den Messungen im Sterilbereich waren aber bei der Herstellung der HE-Milchproben die Aufheiz- und Abkühlphasen im Verhältnis zur Heißhaltezeit im Heißhalte-Modul relativ groß, d.h. bei jeder Temperatur werden bei der Dimroth-Umlagerung im Verlauf der Aufheiz-, Halte- und Abkühlphase unterschiedliche Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  durchlaufen, so daß für die berechnete äquivalente Heißhaltezeit bei der gewählten Prozeßtemperatur im HE-Bereich zu hohe  $z$ -Werte erhalten werden. Darüberhinaus liegt das Ausmaß der Dimroth-Umlagerung bei niedrigen Prozeßtemperaturen und kurzen Heißhaltezeiten teilweise in der Nähe der analytisch vorgegebenen Bestimmungsgrenze.

### 3.2.2 Abschätzung von tatsächlichen m6Ado-Gehalten in wärmebehandelten Milchen

Aus den experimentellen Befunden der Umlagerung im Sterilbereich wurde die Aktivierungsenergie der Dimroth-Umlagerung von m1Ado in m6Ado in Milch berechnet. Die Aktivierungsenergie beträgt 125 kJ/mol und der präexponentielle Arrhenius-Faktor liegt bei  $A = 4,6987 \times 10^{13} \text{ s}^{-1}$ . Werden diese Parameter in die Arrhenius-Gleichung eingesetzt und die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten  $k$  für Prozeßtemperaturen im Bereich der Hoherhitzung gemäß  $k = A \times e^{-E_a/RT}$  berechnet, dann ergeben sich beispielsweise folgende Geschwindigkeitskonstanten:

(a) Prozeßtemperatur: 86 °C  
 $(k = 4,6987 \times 10^{13} \times e^{-125000 \text{ J} / 8,314 \text{ J/k mol} \times 359,15 \text{ K}})$   
 $k = 3,10 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$

(b) Prozeßtemperatur: 125 °C  
 $(k = 4,6987 \times 10^{13} \times e^{-125000 \text{ J} / 8,314 \text{ J/k mol} \times 398,15 \text{ K}})$   
 $k = 1,87 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

Werden die erhaltenen Werte für  $k$  in das Geschwindigkeitsgesetz einer Reaktion 1. Ordnung eingesetzt, so ergeben sich für die Heißhaltezeiten entsprechend HE 1.5 und 5.4 folgende m1Ado-Konzentrationen:

(a) Prozeßtemperatur 86 °C

$$\begin{aligned}
 [A]_t &= [A]_{t=0} \times e^{-kt} \\
 &= 0,40 \text{ } \mu\text{mol/l} \times e^{-3,10 \times 10^{-5} \times 48,6} \quad (\text{Probe HE 1.5}) \\
 &= 0,40 \text{ } \mu\text{mol/l} \times 0,9985 \\
 &= 0,3994 \text{ } \mu\text{mol/l m1Ado} \quad (\text{entspricht } 0,0006 \text{ } \mu\text{mol/l m6Ado})
 \end{aligned}$$

(b) Prozeßtemperatur: 125 °C

$$\begin{aligned}
 [A]_t &= [A]_{t=0} \times e^{-kt} \\
 &= 0,40 \text{ } \mu\text{mol/l} \times e^{-1,87 \times 10^{-3} \times 46,2} \quad (\text{Probe HE 5.4}) \\
 &= 0,40 \text{ } \mu\text{mol/l} \times 0,9172 \\
 &= 0,3669 \text{ } \mu\text{mol/l m1Ado} \quad (\text{entspricht } 0,0331 \text{ } \mu\text{mol/l m6Ado})
 \end{aligned}$$

Beim Vergleich mit den in Tabelle 1 aufgeführten Analysenergebnissen fällt auf, daß der gemessene Wert für m6Ado bei der Probe HE 1.5 stark von dem berechneten Wert abweicht, d.h. es lag de facto eine stärkere Wärmebelastung vor, als sie aufgrund der äquivalenten Heißhaltezeit (scheinbar) vorgelegen hatte. Bei der HE-Milchprobe 5.4 stimmen jedoch der berechnete und der gefundene m6Ado-Wert sehr gut überein, da die Beeinflussung der Heißhaltezeit durch die Aufheiz- und Abkühlphasen geringer und damit eine korrekte Berechnung der tatsächlichen äquivalenten Heißhaltezeit möglich ist.

### 3.3 Bildung von N6-Methyladenosin in Milchen des Pasteurisierung-(Kurz- und Langzeiterhitzungs)- und Thermisierungsbereichs

Bei den liquidchromatographischen Analysen der PT-Milchproben konnten nur bei der Langzeitpasteurisierung (Probe PT 1.4) und bei der Probe PT 3.3 geringe Gehalte an m6Ado nachgewiesen werden (Tab. 3). Aufgrund der Meßergebnisse und aufgrund der gezeigten Berechnungen (3.2.2) bleibt festzuhalten, daß die thermisch induzierte Dimroth-Umlagerung bei Temperatur-Zeit-Bedingungen der Pasteurierungs- und Thermisierungsbereiche vernachlässigbar gering ist.

Rechnerisch konnte abgeschätzt werden, daß die Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin ab einer Heißhaltezeit von 300 s bei einer Prozeßtemperatur von 110 °C (entspricht einem  $F_0$ -Wert von ca. 0,4 min) unter den gegebenen liquidchromatographischen Voraussetzungen analytisch zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.

## 4. Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Bei der Wärmebehandlung von Milch wird das originäre Milchrbonucleosid 1-Methyladenosin in einer Dimroth-Umlagerung zum N6-Methyladenosin umgesetzt. Eine auf 3,5 % Fettgehalt eingestellte und homogenisierte Milch wurde unter definierten Temperatur-Zeit-Bedingungen im Hoherhitzungsbereich erwärmt. Die liquidchromatographischen Analysen der Milchproben ergaben, daß die Dimroth-Umlagerung zum N6-Methyladenosin im untersuchten Erhitzungsbereich einer Reaktionskinetik 1. Ordnung unterliegt. Allerdings muß im Gegensatz

zu den Messungen im Sterilbereich (lange Heißhaltezeiten) bei der Messung der Hoherhitzungsmilchproben beachtet werden, daß die Aufheiz- und Abkühlphasen im Verhältnis zur Heißhaltezeit im Heißhaltemodull relativ groß sind, d.h. bei jeder Temperatur werden bei der Dimroth-Umlagerung im Verlauf der Aufheiz-, Halte- und Abkühlphase Temperaturen durchlaufen, die mit unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für die Umlagerung einhergehen, so daß für die berechnete äquivalente Heißhaltezeit bei der gewählten Prozeßtemperatur im HE-Bereich zu hohe Werte für die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erhalten werden. Diese Aussage wurde durch entsprechende Berechnungen bestätigt. So konnte im Bereich einer Prozeßtemperatur von 86 °C gezeigt werden, daß der rechnerisch ermittelte Gehalt deutlich unter dem experimentell bestimmten Wert an umgelagertem N6-Methyladenosin lag, d.h. es lag de facto eine stärkere Wärmebelastung vor, als sie aufgrund der äquivalenten Heißhaltezeit bei der vorgegebenen Prozeßtemperatur (scheinbar) vorgelegen hatte. Darüberhinaus liegt das Ausmaß der Dimroth-Umlagerung bei niedrigen Prozeßtemperaturen und kurzen Heißhaltezeiten im Hoherhitzungsbereich teilweise in der Nähe der analytisch vorgegebenen Bestimmungsgrenze. Bei höheren Temperaturen und längeren Heißhaltezeiten stimmen im Hoherhitzungsbereich dagegen die berechneten mit den gefundenen Werten an umgelagertem Produkt sehr gut überein, so daß die reaktionskinetischen Parameter (Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$ , Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$  und Dezimalreduktionswert  $D$ ) berechnet werden können. Rechnerisch konnte abgeschätzt werden, daß die Dimroth-Umlagerung ab einer Heißhaltezeit von 300 s bei einer Prozeßtemperatur von 110 °C (entsprechend einem  $F_0$ -Wert von ca. 0,4 min) zweifelsfrei nachgewiesen und hinsichtlich der Wärmebelastung der Milch als Indikator verwendet werden kann.

Aufgrund der vorgenannten Meßergebnisse und der reaktionskinetischen Voraussetzungen der Dimroth-Reaktion bleibt festzuhalten, daß die thermisch induzierte Dimroth-Umlagerung bei Temperatur-Zeit-Bedingungen des Pasteurierungs- bzw. Thermisierungsbereiches vernachlässigbar und als Indikatorreaktion für diesen Wärmebelastungsbereich nicht geeignet ist.

## 5. Literatur

- (1) Gil, A., Sanchez-Medina, F.: J. Dairy Res. **49** 295-300 (1982)
- (2) Tiemeyer, W., Stohrer, M., Giesecke, D.: J. Dairy Sci. **67** 723-728 (1984)
- (3) Schlimme, E., Boos, K.-S., Frister, H., Pabst, K., Raezke, K.-P., Wilmers, B.: Milchwissenschaft **41** 757-762 (1986)
- (4) Raezke, K.-P., Schlimme, E.: Z. Naturforsch. **45c** 655-662 (1990)
- (5) Schlimme, E., Raezke, K.-P., Ott, F.-G.: Z. Ernährungswiss. **30** 138-152 (1991)
- (6) Schneehagen, K., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **44** 67-74 (1992)
- (7) Topp, H., Groß, H., Heller-Schöch, G., Schöch, G.: Nucleosides & Nucleotides **12** 585-596 (1993)
- (8) Schlimme, E., Schneehagen, K.: Z. Naturforsch. **50 c** 105-113 (1995)

- (9) Ott, F.-G., Schlimme, E.: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte **43** 213-217 (1991)
- (10) Schlimme, E., Ott, F.-G., Kiesner, C.: *Int. Dairy Journal* **4** 617-627 (1994)
- (11) Schlimme, E., Ott, F.G., Kiesner, C., Biewendt, H.G.: *IDF Special Issue 9303*, 52-66 (1994)
- (12) Martin, D., Kiesner, C., Schlimme, E.: *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **47** 75-86 (1995)
- (13) Kiesner, C.: Persönliche Mitteilung 1995 (vgl. 2. Kapitel dieses Berichtes)
- (14) Schlimme, E., Boos, K.-S.: *Journal of Chromatography Library*, Vol. **45c** C115-C145 (1990)
- (15) Boos, K.-S., Wilmers, B., Sauerbrey, R., Schlimme, E.: *Ger. Pat.*, P 361 7805.5 (1986)
- (16) Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E., Sauerbrey, R.: *J. Chromatogr.* **456** 93-104 (1988)
- (17) Raezke, K.-P., Wilmers, B., Boos, K.-S., Schlimme, E.: *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* **40** 53-62 (1988)
- (18) Raezke, K.-P., Boos, K.-S., Wilmers, B., Schlimme, E.: *Milchwissenschaft* **43** 224-229 (1988)
- (19) Chheda, G.B., Hong, C.I.: *J. Med. Chem.* **14** 748-753 (1971)
- (20) Martin, D., Schlimme, E.: *Z.Naturforsch.* **49 c** 834-842 (1994)
- (21) Fromherz, H.: *Physikalisch-chemisches Rechnen in Wissenschaft und Technik*. Verlag Chemie, Weinheim (1966)
- (22) Wallhäusser, K.H.: *Praxis der Sterilisation - Desinfektion - Konservierung*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1988)
- (23) Brookes, P., Lawley, P.D.: *J. Chem. Soc.* **1960** 539-545
- (24) Cf. Elion, „Ciba Foundation Symposium on the Chemistry and Biology of Purines“, J. and A. Churchill Ltd., London, 1957, p. 39.
- (25) Macon, J.B., Wolfenden, R.: *Biochemistry* **7** 3453-3458 (1968)



**Tabelle 1**

**Gehalte an 1-Methyladenosin und N6-Methyladenosin in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Hoherhitzung (HE)**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	Heißhaltezeit (äquival.) $\tau$ (s)	m1Ado $C_{Ao}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>b</sup>	m1Ado $C_{At}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>c</sup>	m1Ado ( $C_{Ao} - C_{At}$ ) ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>d</sup>	m6Ado $C_{bt}$ ( $\mu\text{mol/l}$ ) <sup>e</sup>
HE 1.1 - 1.5	86	5,75; 15,0; 25,8; 45,9; 48,6	0,399; 0,397; 0,403; 0,389; 0,399	0,392; 0,394; 0,397; 0,372; 0,363	0,007; 0,003; 0,006; 0,017; 0,036	0,003; 0,004; 0,007; 0,006; 0,027
HE 2.1 - 2.5	95	5,4; 14,8; 25,7; 45,6; 62,4	0,399; 0,397; 0,403; 0,389; 0,399	0,384; 0,385; 0,385; 0,365; 0,354	0,015; 0,012; 0,018; 0,024; 0,045	0,002; 0,006; 0,012; 0,015; 0,027
HE 3.1 - 3.4 <sup>a</sup>	105	5,3; 14,7; 25,5; 45,5	0,399; 0,397; 0,403; 0,389	0,375; 0,372; 0,382; 0,363	0,022; 0,025; 0,021; 0,026	0,007; 0,010; 0,019; 0,020
HE 4.1 - 4.4 <sup>a</sup>	115	5,36; 14,8; 25,6; 45,0	0,399; 0,397; 0,403; 0,389	0,375; 0,369; 0,369; 0,352	0,024; 0,028; 0,034; 0,037	0,014; 0,019; 0,028; 0,029
HE 5.1 - 5.4 <sup>a</sup>	125	6,48; 16,2; 26,88; 46,2	0,399; 0,397; 0,403; 0,389	0,345; 0,369; 0,355; 0,330	0,054; 0,028; 0,048; 0,059	0,020; 0,020; 0,032; 0,033

(a) Die Temperatur-Zeit-Kombinationen HE 3.5, HE 4.5 und HE 5.5 wurden in die Auswertung nicht einbezogen, da eine korrekte Bestimmung der jeweiligen äquivalenten Heißhaltezeit nicht möglich war.

(b) Konzentration von m1Ado ( $\mu\text{mol/l}$ ) in der Fett-eingestellten, thermisierten und homogenisierten Versuchsmilch vor der Erhitzung.

(c) Konzentration von m1Ado ( $\mu\text{mol/l}$ ) in der Versuchsmilch nach der jeweiligen Heißhaltezeit  $\tau$  (s).

(d) Differenz der Konzentration von m1Ado in der jeweiligen Versuchsmilch vor und nach der Erhitzung.

(e) Konzentration von m6Ado ( $\mu\text{mol/l}$ ) in der Versuchsmilch nach der jeweiligen Heißhaltezeit  $\tau$  (s); die angegebenen Gehalte an m6Ado sind um den entsprechenden m6Ado-Ausgangswert der Versuchsmilch korrigiert.

**Tabelle 2**

**Übersicht von reaktionskinetischen Parametern aus Analyseergebnissen  
des HE-Bereichs**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	$r^{(b)}$	$k^{(c)}$ [s <sup>-1</sup> ]	$\tau_{1/2}^{(d)}$ [s]	$D^{(e)}$ [s]	log D
HE 1.1 - 1.5	86	- 0,8745	$1,1248 \times 10^{-3}$	616,2	2047,5	3,3112
HE 2.1 - 2.5	95	- 0,9697	$1,1736 \times 10^{-3}$	590,6	1962,4	3,2928
HE 3.1 - 3.4 <sup>a</sup>	105	- 0,9886	$1,5335 \times 10^{-3}$	452,0	1501,8	3,1766
HE 4.1 - 4.4 <sup>a</sup>	115	- 0,9686	$1,9625 \times 10^{-3}$	353,2	1173,5	3,0695
HE 5.1 - 5.4 <sup>a</sup>	125	- 0,9510	$2,0721 \times 10^{-3}$	334,5	1111,4	3,0459

- (a) Die Temperatur-Zeit-Kombinationen HE 3.5, HE 4.5, HE 5.5 wurden in die Auswertung nicht einbezogen, da eine korrekte Bestimmung der jeweiligen äquivalenten Heißhaltezeit nicht möglich war.
- (b) Korrelationskoeffizient  $r$  der linearen Regression (bei der Auftragung  $\log(C_{A0} - C_{Bt})$  über äquivalente Heißhaltezeit  $\tau$  (s)).
- (c) Reaktionsgeschwindigkeitskonstante  $k$  (s<sup>-1</sup>).
- (d) Halbwertszeit  $\tau_{1/2}$ , berechnet gemäß  $\tau_{1/2} = \ln 2/k$  (s) (gilt für Reaktionen 1. Ordnung).
- (e) Dezimalreduktionswert ;  $D = 2,303 / k$  (s).

**Tabelle 3**

**Gehalte an 1-Methyladenosin und N6-Methyladenosin in Milch unter Temperatur-Zeit-Bedingungen der Pasteurisierung-Thermisierung (PT)**

Proben	Prozeß- temperatur $\vartheta$ (°C)	Heißhaltezeit (äquival.) $\tau$ (s)	m1Ado $C_{A_0}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	m6Ado $C_{B_1}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )
RM <sup>a</sup> 23.05.95	-	-	0,375	n.d.
PT 1.1 - 1.4	62	20, 40, 76, (1800)	0,369; 0,364; 0,370; 0,366	n.d.; n.d.; n.d.; 0,012
PT 2.1 - 2.3	72	20, 40, 76	0,379; 0,366; 0,364	n.d.; n.d.; n.d.
PT 3.1 - 3.3	75	20, 40, 76	0,364; 0,365; 0,348	n.d.; n.d.; 0,023

(a) RM= Rohmilch

(b) Die Probe 1.4 wurde nicht in der Versuchsanlage zur kontinuierlichen Erhitzung von Milch, sondern in einer 5l-Aluminium-Milchkanne durch Erwärmen im Wasserbad hergestellt.

n.d.: nicht detektierbar

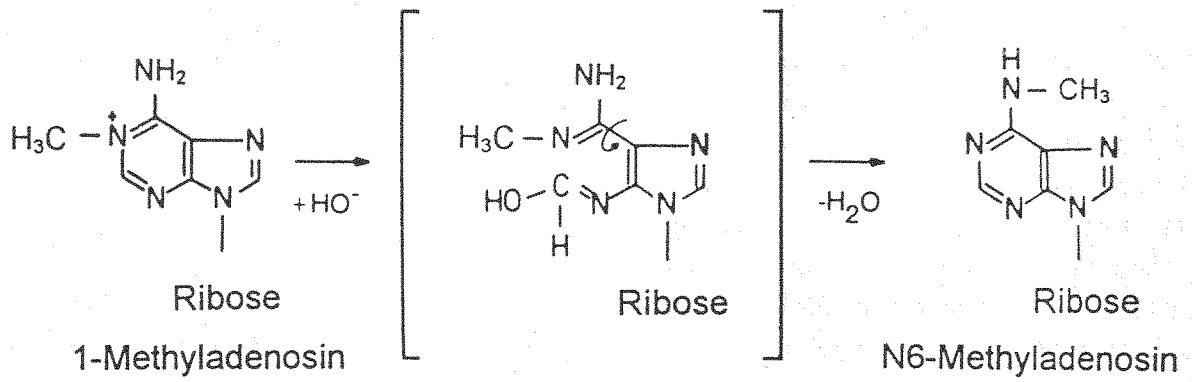


Abb. 1: Dimroth-Umlagerung von 1-Methyladenosin in N6-Methyladenosin