

Über die Reaktion von $\Delta^9, 12$ -Linolsäureester in Wasser, 6. Mitt.:
Chromatographische Untersuchungen über die Zusammen-
setzung des Präparates „LHPO“ und die Isolierung der ein-
zelnen tumorwirksamen Hydroperoxydkomponenten

Von

E. Schauenstein und H. Esterbauer

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Graz, Österreich

Mit 6 Abbildungen

(Eingegangen am 8. November 1962)

In einer Reihe vorangegangener Arbeiten wurde mitgeteilt, daß bei mehrtägigem Dispergieren von Linolsäureester in bidestill. Wasser bei 40° ein komplex zusammengesetztes Reaktionsprodukt erhalten wird, das zwei besonders interessante Eigenschaften aufweist: Wasserlöslichkeit und Gehalt an neuartigen Lipidhydroperoxyden (Schauenstein und Mitarbeiter¹).

Durch einen entsprechenden Aufarbeitungsgang wurde ein Produkt erhalten (Präp. III), dessen Wasserlöslichkeit max. ca. 0,4% beträgt und dessen Gehalt an Lipidhydroperoxyden auf durchschnittlich 50 Gewichtsprozent angereichert werden konnte. Dieser Hydroperoxydanteil ergibt sich aus dem Durchschnittsmolekulargewicht des Präparates III von 350 bis 360 und einem Peroxyd Gehalt entspr. 20 bis 22 γ /aktiven Sauerstoffes. Auf Grund der Wasserlöslichkeit des Präp. III wurden damit stabile und klare wäßrige Lösungen hergestellt, deren Konzentration durchschnittlich 2 bis 4 g/l und deren Peroxyd Gehalt 40 bis 100 γ akt. Sauerstoff/ml betrug. Diese Lösung wurde in den bisherigen Untersuchungen kurz mit „Präparat LHPO“ (Lipidhydroperoxyde) bezeichnet.

Damit standen die Lipidhydroperoxyde für biologische Versuche in wasserlöslicher Form zur Verfügung, und es wurden damit eine Reihe interessanter Befunde erhoben. So wurde festgestellt, daß die Hydroperoxyde Atmung, aerobe und anaerobe Glykolyse von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen, sowie von Hefezellen in charakteristischer Weise hemmen,

¹ E. Schauenstein, G. Schatz und G. Benedikt, (4. Mitt.), Mh. Chem. **92**, 442 (1961).

gegenüber Katalase vollkommen resistent sind und die Glykolyse nicht über eine Senkung des intrazellulären DPN-Spiegels, sondern durch oxydative Inaktivierung bestimmter SH-Enzyme der Glykolysekette hemmen (*Schauenstein* und Mitarbeiter²). Hierbei werden mit hoher Spezifität nur die Triosephosphatdehydrogenase und Milchsäuredehydrogenase gehemmt. Dies wurde nicht nur an den isolierten Enzymen, sondern auch an den intakten Tumorzellen eindeutig sichergestellt (*Schauenstein* und Mitarbeiter³). In Tierversuchen ergab sich eine 100proz. Hemmung des Tumorwachstums, wenn eine Million Zellen mit 1,0 γ aktiven Sauerstoffes *in vitro* inkubiert und anschließend transplantiert wurden (*Zangger, Ratzenhofer, Schauenstein*⁴).

Wenn auch durch Versuche mit den mit SnCl_2 -reduzierten Präparaten gezeigt werden konnte, daß die Befunde wohl vor allem den Hydroperoxydgruppen zuzuordnen sind, so kann doch nicht übersehen werden, daß es sich um Befunde handelt, die mit einem Mischpräparat erhalten wurden, von dem nur der Gehalt an Lipidhydroperoxyden, über dessen sonstige Zusammensetzung aber nur sehr wenig bekannt war.

Die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit aller bisherigen biochemischen und biologischen Versuchsergebnisse ließ wohl eine weitgehende Konstanz der chemischen Zusammensetzung des Präparates mit aller Wahrscheinlichkeit annehmen. Dennoch fehlte bisher ein eindeutiger analytischer Nachweis. Außerdem war über Zahl und Art der Bestandteile des Präparates nichts bekannt.

Um in diesen, für die weiteren Versuche grundlegend wichtigen Fragen weiterzukommen, wurde die Analyse mittels der Dünnschichtchromatographie in Angriff genommen. Über die bisher damit gewonnenen Ergebnisse soll im folgenden berichtet werden.

Für Versuche einer qualitativen und angenähert quantitativen Auftrennung des bisherigen Mischpräparates III kam nur eine Methode in Betracht, bei der die überaus empfindlichen Persauerstoffverbindungen erhalten bleiben. Nur auf diese Weise würde es möglich, die einzelnen peroxyd(PO)-aktiven Substanzen von den nichtperoxydischen Bestandteilen zu unterscheiden, abzutrennen und sie schließlich gesondert auf ihre biologische Aktivität zu testen. Diese Forderung beinhaltet den strengen Ausschluß von Licht, erhöhter Temperatur und langen Arbeitszeiten. Damit war klar geworden, daß die Dünnschichtchromatographie in diesem Fall am aussichtsreichsten einzusetzen wäre, und wir begannen unsere Versuche mit einer Ausrüstung, die uns zuerst über Anregung und Vermittlung der Nitritfabrik (Feldkirchen bei München), später als Leihgabe

² E. Schauenstein, G. Schatz und M. Taufer (1. Mitt.), Z. Krebsforsch. 64, 465 (1962).

³ E. Schauenstein, M. Taufer und G. Schatz (5. Mitt.), Mh. Chem. 93, 544 (1962).

⁴ J. Zangger, M. Ratzenhofer und E. Schauenstein (2. Mitt.), Z. Krebsforsch. 64, 473 (1962).

des Österreichischen Krebsforschungsinstitutes Wien in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt wurde. Wir verwendeten als Adsorbens Kieselgel G nach Stahl, das nach Lufttrocknung eine Stunde bei 110° C aktiviert worden war. Auf die Platten wurden jeweils 100 bis 200 γ Präp. III, in Chloroform gelöst, am Startpunkt aufgetragen. Als Fließmittel diente eine Mischung von n-Hexan—Äther 3:2. Die Steighöhe wurde

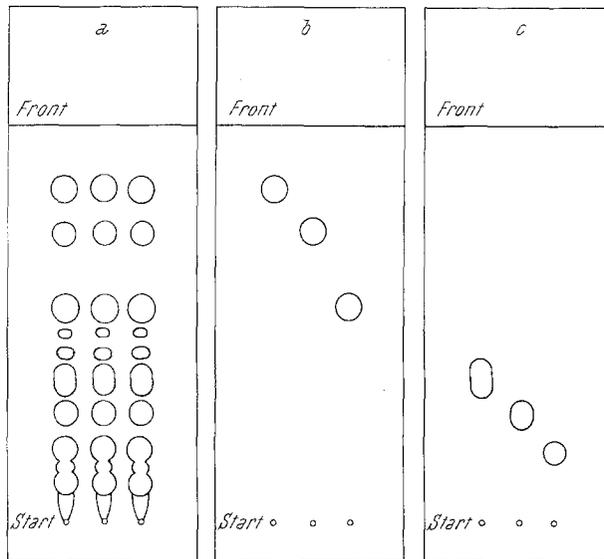


Abb. 1. Dünnschichtchromatogramme. Adsorbens: Kieselgel G, Merck, Fließmittel: Hexan—Äther 3:2. Anfärbung: 25proz. alkohol. Phosphormolybdänsäurelösung

- a: Präparat III (Gesamtpräparat)
 b: Substanzen mit R_F 0,83—0,85
 0,71—0,72
 0,50—0,55 } säulenchromatographisch aus Präp. III gewonnen
 c: Substanzen mit R_F 0,85—0,37
 0,25—0,28
 0,18—0,20

einheitlich mit 10 cm festgelegt. Gearbeitet wurde stets bei 20° C unter Lichtausschluß und ohne Kammerübersättigung.

Abb. 1 a zeigt ein Chromatogramm nach Anfärbung mit 25proz. alkohol. Phosphormolybdänsäurelösung. Zwischen Start und Front sind 9 abgegrenzte Flecke zu erkennen, die von oben nach unten beziffert werden, wobei R_F 0,10—0,20 und 0,0—0,10 zusammengefaßt werden. Die zugehörigen R_F -Werte bringt Tab. 1. Dieses erste Ergebnis stimmt mit der gaschromatographischen Auftrennung, die im Laboratorium von W. Schrade* mit dem Präp. III vorgenommen worden war, einigermaßen

* Wir erlauben uns, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. W. Schrade (Mediz. Univ.-Klinik, Frankfurt a. M.) und seinen Mitarbeitern für die liebenswürdige Durchführung der gaschromatischen Analyse herzlichst zu danken.

überein (vgl. Abb. 2). Allerdings gibt das Gaschromatogramm keinen Aufschluß darüber, welche der Komponenten Hydroperoxydgruppen enthalten, da die oxydierenden Gruppen vorher mit SnCl_2 reduziert worden waren, um das Präparat unempfindlicher gegen die hohen Arbeitstemperaturen zu machen.

Diesen überaus wichtigen Aufschluß gibt jedoch das Dünnschichtchromatogramm, wenn man die Platte, z. B. erst mit einer Fe^{2+} -Lösung

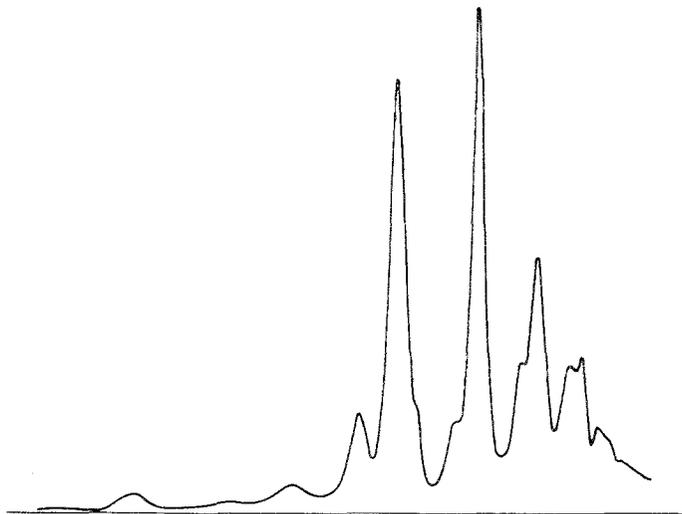


Abb. 2. Gaschromatogramme des mit SnCl_2 reduzierten Gesamtpräparates III (nach *W. Schrader* und Mitarb.)

und sodann nach 10 Min. Einwirkung mit einer Lösung von p-Dichlorphenolindophenol besprüht**. Auch das Besprühen der Platten mit Lösungen von $\text{Fe}(\text{CNS})_2$ oder p-Nitrodimethylanilin liefert analoge Ergebnisse. Alle diese Reagentien geben mit Peroxyden und Hydroperoxyden typische Farbreaktionen und machen somit unter den bisher gefundenen 9 Komponenten die peroxyd-aktiven Substanzen selektiv sichtbar.

Die Abb. 3 a und 3 b geben auf diese Weise angefärbte Dünnschichtchromatogramme wieder (vgl. hiezu auch Tab. 1).

Daraus ergeben sich folgende Aussagen:

1. Präp. III besteht, wie erwartet, aus peroxydischen und nichtperoxydischen Komponenten.
2. Die nicht-peroxydischen Komponenten stellen einen Bestandteil dar, der in 6 Flecken zum Ausdruck kommt.
3. Der peroxydische Anteil verteilt sich auf 4 Flecke. Sie entsprechen Lipidhydroperoxyden unterschiedlicher chemischer Konstitution.

** Kolorimetrische Bestimmung von Lipidperoxyden nach *Hartman*⁵.

⁵ *L. Hartman*, *J. Sci. Food Agric.* 5, 476 (1954).

4. Der nichtperoxydische Anteil ist im wesentlichen in den Flecken mit R_F 0,25 bis 0,28, 0,18 bis 0,20, 0,08 bis 0,10 konzentriert, während die Flecke mit R_F 0,71 bis 0,72 und 0,35 bis 0,37 den Hauptteil der Hydroperoxyde enthalten.

Wie die Abb. 1 und 3 sowie Tab. 1 zeigen, ist mit den zunächst verwendeten Fließmitteln nur im R_F -Bereich von etwa 0,2 bis 1 eine befriedigende Auftrennung möglich.

Im Startbereich bis R_F 0,1 ist die Auftrennung noch nicht ausreichend, um über Zahl und Einheitlichkeit der in diesem Bereich erscheinenden

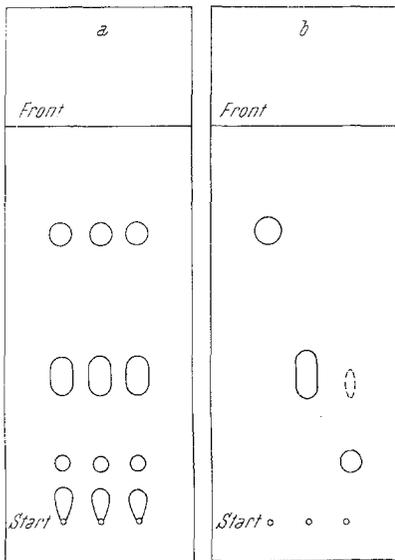


Abb. 3. Dünnschichtchromatogramme Adsorbens: Kieselgel G. Merck, Fließmittel: Hexan—Äther 3:2. Anfärbung: nach *Täufel* bzw. *Hartman*.

a: Präparat III (Gesamtpräparate)

b: Substanzen mit

R_F 0,71—0,72 } säulenchromatographisch
 0,35—0,37 } aus Präp. III gewonnen
 0,10—0,15 }

aus der Kieselgelschicht der Platte mit einer Mischung von Benzol—Methanol 3:7 zu extrahieren, in den Extrakten den aktiven Sauerstoff nach *Hartman* quantitativ zu bestimmen und die ermittelten Werte zu der insgesamt aufgetragenen Menge aktiven Sauerstoffes in Beziehung zu setzen. Tab. 2 bringt die quantitative Verteilung der Peroxydfractionen in verschiedenen Präparaten III, die aus verschiedenen Rühransätzen und unter Verwendung verschiedener Ausgangspräparate erhalten wurden.

Man ersieht daraus eindeutig, daß Präparat III, unabhängig von Rühransatz und Ausgangsmaterial, stets die gleichen Peroxydfractionen in praktisch gleichen Anteilen enthält. Im übrigen zeigen die Chromatogramme von etwa 20 Ansätzen, daß auch stets die gleichen nichtperoxy-

Komponenten bereits endgültige Aussagen zu machen. Diese sind nur bei Verwendung speziell für das Startgebiet abgestimmter Fließmittel zu erwarten, worüber in einer späteren Arbeit berichtet werden wird. Gleichwohl ermöglichen die bisherigen Befunde die Erkennung der konstant auftretenden peroxydischen Komponenten, von denen LHPO-2, -6 und -8 auch nach säulenchromatographischer Auftrennung des Gesamtpräparates sich als einheitlich erwiesen (vgl. S. 171 bzw. Abb. 4 und 5).

Nachdem die bisherigen biologischen Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Hydroperoxydgruppe als Wirkungsgruppe und damit die Lipidhydroperoxyde in Präparat III als die biologisch wirksamen Substanzen anzusehen sind, konzentrierte sich unser Interesse zunächst nur auf die peroxydischen Bestandteile.

In weiteren Versuchen gelang es, die einzelnen LHPO-Komponenten

dischen Anteile mit nahezu konstanter Intensität der Flecke auftreten. Daraus ergibt sich, daß Präparat III ein definiertes Reaktionsprodukt mit praktisch konstanter Zusammensetzung darstellt. Diese Feststellung

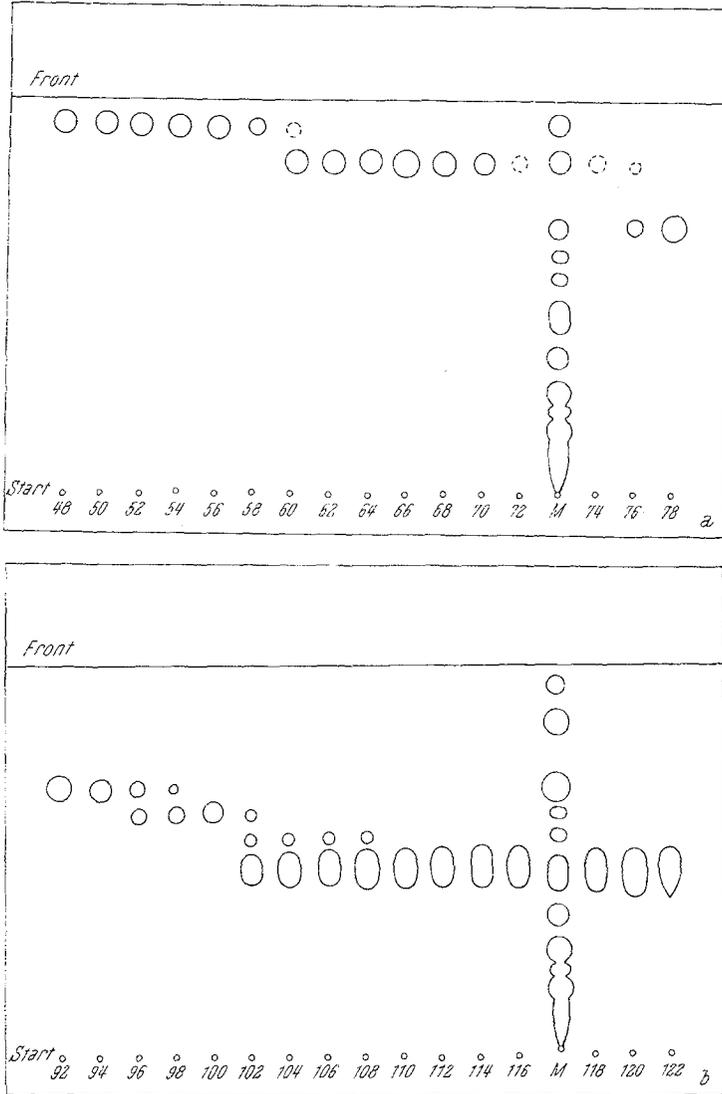


Abb. 4 a, b

Abb. 4. Dünnschichtchromatogramme. Adsorbens: Kieselgel G, Merck, Fließmittel: Hexan—Äther 3:2, Anfärbung: 25proz. alkohol. Phosphormolybdänsäurelösung

a bis d: Überprüfung der einzelnen Blutfaktionen aus einer Säulentrennung von Präp. III, Fraktionen 48 bis 196

Zwischen Frak. 72 u. 74	} jeweils Leitchromatogramm des Gesamtpräparates III
116 u. 118	
152 u. 154	
191 u. 192	

ist bemerkenswert, wenn man bedenkt, daß in Präparat III mindestens 10 Komponenten anwesend sind, die in zahlreichen, gleichzeitig oder nacheinander ablaufenden Einzelreaktionen entstehen.

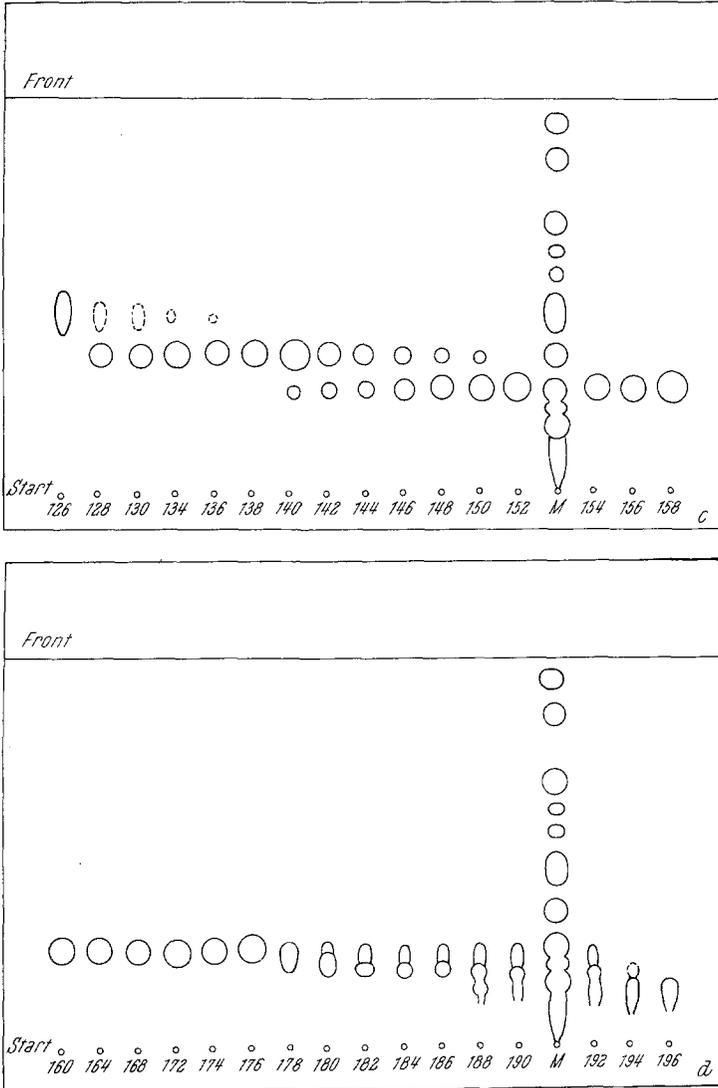


Abb. 4 c, d

Die Zahlen der Tab. 2 ergeben, daß die Gesamt-Lipidhydroperoxyde aus Präparat III durchschnittlich zu über 80% aus der Platte in aktivem Zustand eluierbar sind. Nachdem in der Literatur darauf hingewiesen wird, daß an Kieselgel adsorbierte Stoffe niemals vollständig herausgelöst

werden können, entspricht unsere Ausbeute wohl dem maximal möglichen Wert (*Mangold*⁶).

LHPO-6 macht den Hauptbestandteil mit rund 40% aus, dann folgen LHPO-2 mit rund 20, LHPO-9 mit rund 17 und schließlich LHPO-8 mit rund 7%.

Der hiemit vorgelegte experimentelle Nachweis der im wesentlichen konstanten chemischen Zusammensetzung von Präparat III erklärt die bereits mitgeteilte Tatsache, daß mit der wäßrigen Lösung von Präparat III gut reproduzierbare biologische Effekte festgestellt wurden, sofern man sich auf akt. Sauerstoff/ml Lösung bezog. Über die chemischen und biologischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten des Präparates III konnte natürlich noch nichts ausgesagt werden.

Hiefür ist die vorstehend beschriebene Auftrennung des Präparates die erste Voraussetzung. Da die aus den Dünnschichtplatten eluierbaren Mengen im Mikrogrammbereich liegen, mußte nach einer Möglichkeit gesucht werden, die Komponenten milligrammweise und in möglicher Reinheit zu isolieren.

Hiezu wurden die dünnstschichtchromatographischen Befunde auf die präparative Säulenchromatographie übertragen*.

Prüft man die Einzelfractionen (je 10 ml) solcher Säuleneeluat neuerlich dünnstschichtchromatographisch, so erhält man das in der Abb. 4 dargestellte Ergebnis, aus dem hervorgeht, daß die Reindarstellung der Einzelkomponenten des Präparates III auf diesem Wege grundsätzlich möglich ist.

Abb. 5 bringt das Ergebnis von Peroxydbestimmungen an den einzelnen Eluatfraktionen (Bestimmungsmethodik nach *Hartman*) und zeigt die scharfe Verteilungscharakteristik der peroxydischen Komponenten LHPO-2, -6 und -8.

Vereinigt man die Eluatfraktionen, in denen die einzelnen Komponenten enthalten sind, und gewinnt daraus die Trockenrückstände, so zeigt das Dünnschichtchromatogramm eindeutig, daß einheitliche Komponenten erhalten wurden, die hinsichtlich ihres R_F -Wertes den Komponenten des Gesamtpräparates III entsprechen: Abb. 1 b, c und 3 b.

Damit stehen der chemischen Analyse und der biologischen Testung der einzelnen Lipidhydroperoxyde des Präparates III keine prinzipiellen Schwierigkeiten mehr entgegen. Die diesbezüglichen Untersuchungen

* Über die Methodik der säulenchromatographischen Trennung und die Isolierung der Einzelkomponenten wird an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

⁶ *H. Mangold*, J. Amer. Oil Chemists' Soc. **38**, 717, 718 (1961).

sind im Gange und über ihre Ergebnisse wird zu gegebener Zeit ausführlich berichtet werden.

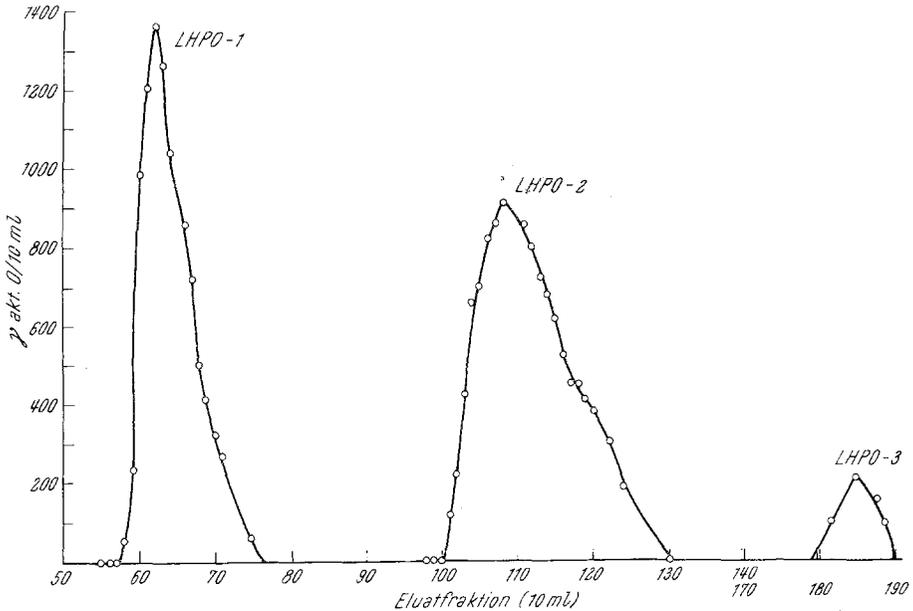


Abb. 5. Fraktionsdiagramm der säulenchromatographischen Auftrennung von Präp. III, Peroxyd-gehalte gemessen nach Hartman
(Statt LHPO-1, -2 und -3 lese man: LHPO-2, -6, -8)

Tabelle 1

R_F	Gefärbt mit		Komp.-Nr.
	PMO	Fe ²⁺ + Dpi	
0,83—0,85	+ m	—	1
0,71—0,72	+ m	+ m	2
0,50—0,55	+ m	—	3
0,48	+ s schw	—	4
0,43	+ s schw	—	5
0,35—0,37	+ m	+ st	6
0,25—0,28	+ st	—	7
0,18—0,20	+ s st	—	8
0,10—0,15	—	+ s schw	
0,08—0,1	+ s st	—	9
0,00—0,08	+ s st	+ schw	

Verwendete Abkürzungen: PMO = Phosphormolybdänsäure; Dpi = Dichlorphenolindophenol; + = positive Farbreaktion; — = keine Farbreaktion; s schw = sehr schwach; m = mittel; st = stark; s st = sehr stark; schw = schwach.

Zunächst konnte mit den in Milligramm-Mengen isolierten Komponenten LHPO-2 bis -9 neuerlich sichergestellt werden, daß es sich tatsächlich um Lipidhydroperoxyde handelt.

Hiezu wurden die aus den betreffenden Eluatfraktionen gewonnenen peroxydischen Komponenten (LHPO-2 bis -9, vgl. Tab. 1) in Benzol—Methanol (1:1) gelöst. Als Leitelektrolyt wurde LiCl in einer Konzentration von 0,15 m/l zugesetzt. Diese Lösungen wurden polarographiert, und die folgende Abb. 6 zeigt, daß die vier Peroxydkomponenten gut ausgebildete Reduktionsstufen besitzen, die alle Halbwertspotentiale in dem für Hydroperoxyde charakteristischen Bereich von ca. — 1 Volt aufweisen*.

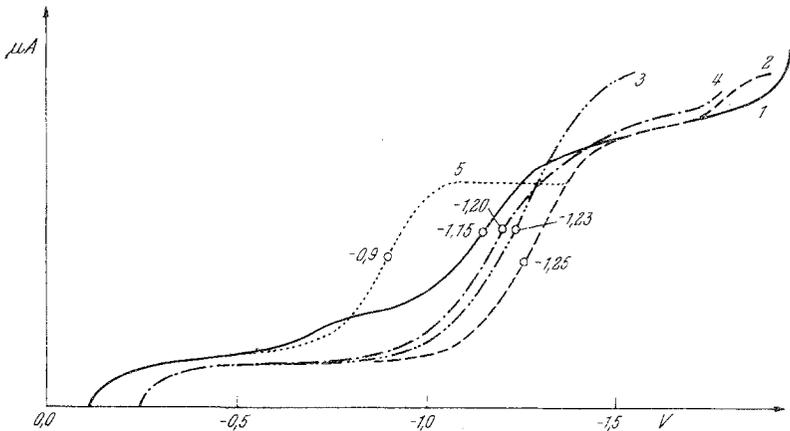


Abb. 6. Polarogramme von LHPO-2 bis -9 und von Linolsäuremethylester-Monohydroperoxyd

Kurve 1: LHPO-2	Empfindlichkeit 150
2: LHPO-6	Empfindlichkeit 300
3: LHPO-8	Empfindlichkeit 500
4: LHPO-9	Empfindlichkeit 200
5: Linolsäuremethylester-Monohydroperoxyd	Empfindlichkeit 200

Die Aktivität gegenüber *Ehrlich*-Ascitestumorzellen wurde zunächst mit LHPO-2 und -6 in vitro getestet.

Auf Grund der bisherigen Messungen läßt sich sagen, daß die reinen Lipidhydroperoxyde 2 und 6 nach aerober Vorinkubation die anaerobe Gärung der EAT-Zellen mit halbmaximaler Dosis von rund 0,4 γ akt. Sauerstoff/Million Zellen hemmen**.

Gemeinsam mit J. Zangger durchgeführte Versuche ergaben, daß das Tumorwachstum zu 100% gehemmt wird, wenn man die Tumorzellen mit dem Hemmstoff im Verhältnis 0,5 γ akt. Sauerstoff pro Million Zellen aerob mischt und unmittelbar danach transplantiert.

Wir danken der *Rockefeller* Foundation New York für die Beistellung von Meßapparaturen.

* W. Klöpffer, Diss. Univ. Graz.

** G. Jaag, Diss. Univ. Graz.

Tabelle 2

Ansatz	Ausgangspräp.	LHPO-2 ($R_F = 0,71-0,72$)		LHPO-6 ($R_F = 0,35-0,37$)		LHPO-8 ($R_F = 0,10-0,15$)		LHPO-9 ($R_F = 0,0-0,08$)		Aufgebracht Aktiv. Sauerst. ($\gamma = 100\%$)	Insg. ehliert Aktiv. Sauerst. %
		γ	%	γ	%	γ	%	γ	%		
AG IV	Fa. Dr. Richter	4,6	16	11,0	38	1,55	5	4,4	15	29	74
	"	3,7	15	9,5	40	1,48	6	3,5	15	24	75
AG V	"	4,0	14	9,0	32	9,90	3	3,8	14	28	63
	"	4,3	15	9,5	34	9,90	3	3,7	13	28	65
AG VI	"	12,0	27	16,0	36	3,70	8	8,0	18	45	89
AG VII	"	19,5	19	48,0	48	10,0	10	15,0	15	100	92
AG VIII	Fa. Roth 95/97	9,5	21	20,5	44	2,5	6	10,0	22	46	93
AG IX	Fa. Dr. Richter	10,0	20	22,6	45	4,0	8	11,5	23	50	96
AG XI	"	14,8	27	21,2	39	4,5	8	8,3	15	54	89
AG XII	Fa. Roth 80/85	12,5	25	17,0	34	4,5	9	10,0	20	50	88
AG XIII	"	49,0	31	56,0	35	9,0	6	33,0	21	158	93
	Mittelwert:	21%		39%		7%		17%			83%