

# Über die Reaktion von $\Delta^{9,12}$ -Linolsäureester in Wasser, 7. Mitt.:

Präparative säulenchromatographische Isolierung  
der einzelnen Substanzen des Präparates „LHPO“

Von

**H. Esterbauer und E. Schauenstein**

Aus dem Institut für physikalische Chemie der Universität Graz

Mit 8 Abbildungen

(Eingegangen am 15. August 1963)

## Einleitung

In der vorangegangenen Mitteilung<sup>1</sup> dieser Reihe wurde gezeigt, daß das „Mischpräparat III“ ein gut reproduzierbares Reaktionsprodukt mit praktisch konstanter Zusammensetzung darstellt. Die bemerkenswerten biologischen Eigenschaften des Mischpräparates III sowie die Erkenntnis, daß es sich hierbei um das Produkt eines neuen Typs der Autoxydation höher-ungesättigter Fettsäuren handelt, ließen es wünschenswert erscheinen, das Mischpräparat in seine einzelnen Substanzen zu zerlegen und diese auch im präparativen Maßstab zu isolieren, um sie chemisch zu analysieren und biologisch zu testen.

In der genannten Arbeit wurde bereits darauf hingewiesen, daß es möglich ist, die dünnstichtchromatographischen Befunde auf die präparative Säulenchromatographie zu übertragen.

Es soll besonders darauf hingewiesen werden, daß bei der Ausarbeitung einer säulenchromatographischen Trennmethode unter allen Umständen die Instabilität einzelner Substanzen, insbesondere der Peroxyde, berücksichtigt werden muß. In hier nicht näher beschriebenen Versuchen<sup>2</sup> wurden die Bedingungen ermittelt, die einerseits eine optimale Auftrennung des Mischpräparates erlauben, andererseits aber noch keine Zersetzung der labilen Komponenten herbeiführen\*. Es konnten

\* Hierüber wird der eine von uns (H. E.) an anderer Stelle ausführlich berichten.

<sup>1</sup> E. Schauenstein und H. Esterbauer, 6. Mitt.: Mh. Chem. **94**, 164 (1963).

<sup>2</sup> H. Esterbauer, Dissertat. Univ. Graz (1962).

zwei Methoden ermittelt werden, mit denen eine befriedigende Auftrennung des Mischpräparates erreicht wird:

Methode a: Auftrennung in einer einzigen Säule in einem Arbeitsgang,

Methode b: Auftrennung in 4 Hauptfraktionen in einer Säule und weitere Subtrennung der Hauptfraktionen in einem zweiten Trenngang.

Zunächst seien diejenigen Punkte mitgeteilt, die beiden Methoden gemeinsam sind:

1. *Apparatives*: Alle Geräte, mit denen die Substanzlösung in Berührung kommt, müssen aus Glas sein, Schliff-fett und Gummi sind zu vermeiden; Verwendung eines Fraktionsschneiders mit 10- bzw. 25ml-Siphon.

2. *Adsorbens*: Als Adsorbens wurde Kieselgel mit einer Korngröße von 0,05—0,2 mm (Merck) verwendet. Das käufliche Präparat enthält Spuren von Schwermetallen, die zu einer deutlichen Zersetzung der Lipidhydroperoxyde führen. Zur Reinigung mußte daher das Kieselgel mit konzentrierter Salzsäure mehrmals ausgezogen, anschließend mit Wasser säurefrei gewaschen und durch ein besonderes Verfahren auf einen Wassergehalt von 7% gebracht<sup>2</sup> werden.

3. *Elutionsmittel*: Als Elutionsmittel verwendeten wir das schon in der Dünnschichtchromatographie hervorragend bewährte System *n*-Hexan—Äther. Es ist hier besonders darauf zu achten, daß der Äther peroxydfrei ist.

4. *Das Füllen der Säule*: Eine gleichmäßige Verteilung des Adsorbens in der Säule ist Voraussetzung für eine gute Trennung. Eine gleichmäßige Füllung erreicht man am besten, indem man sukzessive Kieselgel und Lösungsmittel einfüllt.

5. *Das Aufbringen der Substanz*: Allgemein sollte bei der Säulenchromatographie die Substanz in einem möglichst kleinen Volumen Lösungsmittel aufgebracht werden. Wegen der Labilität der Peroxyde konnte im vorliegenden Fall diese Forderung nicht erfüllt werden. Als zweckmäßig erwies es sich, eine Lösung aufzubringen, die ca. 3000  $\gamma$  aktiven Sauerstoff pro ml Lösungsmittel enthält. Insgesamt darf jedoch nicht mehr als 0,1 g aktiver Sauerstoff, entsprechend ca. 4,4 g Substanz, aufgetragen werden.

6. *Überprüfung der Trennungen*: Die Dünnschichtchromatographie gestattet, in einfacher Weise den Fortgang der Trennungen zu kontrollieren. Von den einzelnen Eluatfraktionen wurden auf eine Dünnschichtplatte ca. 0,02 ml aufgetragen und im Standardfließmittel (Hexan—Äther [3:2]) entwickelt. Abbildungen solcher Chromatogramme (Fraktionschromatogramme) wurden bereits in der vorangegangenen Mitteilung<sup>1</sup> gezeigt.

Will man sich nur über die Verteilung der Peroxyde in den einzelnen Eluatfraktionen informieren, so wird in einem aliquoten Anteil Peroxyd nach der Methode von Hartmann<sup>3</sup> bestimmt. In einzelnen Fällen wurden auch Trockenrückstandsbestimmungen und UV-spektrometrische Überprüfungen der Eluatfraktionen durchgeführt.

7. *Arbeitsbedingungen*: Alle Säulentrennungen wurden bei einer Temperatur von + 8°C und unter Ausschluß von Licht durchgeführt.

<sup>2</sup> L. Hartmann, J. Sci. Food Agric. 5, 476 (1954).

## Auftrennung des Mischpräparates nach Methode a

In eine Säule von 2,3 cm Durchmesser und 100 cm Länge wurden 120 g Kieselgel mit Hexan eingeschlämmt; dann wurden ca. 1,5—3 g Mischpräparat in Chloroform (8—10 ml) auf die Säule aufgebracht. Als Fließmittel dienten 1500 ml *n*-Hexan—Äther, wobei der Äthergehalt kontinuierlich von 0 auf 50% gesteigert wurde; anschließend wurden 400 ml Methanol zugegeben. Die Durchlaufgeschwindigkeit soll 10 ml pro 10 Min. betragen. In der vorangegangenen Mitteilung<sup>1</sup> wurden bereits die Fraktionschromatogramme und PO-Diagramme einer derartigen Trennung gezeigt. Daraus ersieht man, daß es mit dieser relativ einfachen Methode gelingt, die Komponenten des Mischpräparates zwar in reinem Zustand zu isolieren, daß jedoch in zahlreichen Zwischenfraktionen noch zwei Komponenten vorhanden sind (vgl. Abb. 4b, Fraktion 102—108 Abb. 4c, Fraktion 140—150)<sup>1</sup>. Die Ausbeute an reinen Komponenten in bezug auf die eingesetzte Menge Mischpräparat ist daher gering.

Da sich unser Interesse zunächst nur auf einzelne Substanzen des Mischpräparates III richtete, war es zweckmäßig, eine zweite Methode auszuarbeiten, die es gestattet, eine beliebige Komponente in größerem Maßstab zu isolieren, ohne auch die anderen Komponenten auftrennen zu müssen. Als vorteilhaft erwies sich die

## Auftrennung des Mischpräparates nach Methode b

Zum Unterschied von Methode a wird hier die Polarität des Fließmittels nicht kontinuierlich geändert, sondern es werden nacheinander 4 Elutionsmittel steigender Polarität verwendet (250 ml Hexan—Äther [7:3], 300 ml Hexan—Äther [1:1], 250 ml Hexan—Äther [1:3], 250 ml Methanol). Dadurch erhält man 4 Hauptfraktionen A, B, C und D. In den vier Fraktionen müssen die 9 Komponenten des Mischpräparates gruppenweise enthalten sein, wobei mit dem am stärksten polaren Elutionsmittel die Komponenten des  $R_F$ -Bereichs von 0,0—0,1, mit dem unpolaren die Komponenten des  $R_F$ -Bereichs von 0,43—0,85 erhalten werden.

Um die einzelnen Trennschritte und chromatographischen Befunde besser zu dokumentieren und übersichtlicher darzustellen, wurden die Platten im Chromatogrammzusatz zum Zeiss-Spektrophotometer PMQ II photometriert (Wellenzahl  $\nu' = 17\,700$ , Lichtquelle: Wolframlampe, Photozelle: SEV, Empfindlichkeit 10/2, Breite des Spaltbildes auf der Platte ca. 0,9 mm, Anfärbung: Phosphormolybdänsäure). Die Abb. 1 bringt die Photometerkurve eines Mischpräparates III (vgl. hierzu Abb. 1a der vorangegangenen Mitt.<sup>1</sup>). Die einzelnen Peaks entsprechen den Komponenten 1—9. Um die peroxydaktiven Kompo-

Tabelle 1

Präp. III,  
getrennt  
n. Meth. a



	Komp.	ca. % in Präp. III	Substanz-Nr.	Abb.
Hauptfrakt. A	1	2	1	2
	2	2,5	21, 22, 23*	5
	3	2	31, 32, 33	6
Hauptfrakt. B	4	1,5	4	3
	5		5	2, 3
	6	14	61, 62, 63, 64*, 65*	7
Hauptfrakt. C	7	2	7	3, 4
	8	10	81, 82, 83*	4
Hauptfrakt. D	9	60	mindestens 7 Subst.	8

Präp. III,  
getrennt  
n. Meth. b



nenen selektiv sichtbar zu machen, wurde in allen Fällen außer mit Phosphormolybdänsäure auch mit einem spezifischen Peroxyd-reagens angefärbt. Die auf diese Weise als peroxyd-aktiv erkannten Komponenten und Substanzen werden mit \* gekennzeichnet.

Die Zusammensetzung der 4 Hauptfraktionen A—D wurde dünn-schichtchromatographisch überprüft; in den Abb. 1 a—d sind die entsprechenden Photogramme dargestellt. Die auf diese Weise erhaltenen Hauptfraktionen sind wesentlich einfacher zusammengesetzt als das Mischpräparat, und ihre weitere Zerlegung in die einzelnen Komponenten bereitet keine wesentlichen Schwierigkeiten. Außerdem lassen sich ihre prozentuellen Anteile am Mischpräparat gravimetrisch ausreichend genau ermitteln. Danach stellt Hauptfraktion D bei weitem den Hauptanteil mit rund 65% dar (vgl. Tab. 1, Spalte 2). Dies kann man — wegen der unterschiedlichen Anfärbbarkeit verschiedener Stoffe mit Phosphormolybdänsäure allerdings nur qualitativ — auch aus dem Photogramm der Abb. 1 entnehmen.

Um die einzelnen Hauptfraktionen weiter aufzutrennen, werden sie im

Vak. angereichert und wiederum auf eine Kieselgelsäule aufgebracht.

#### Auftrennung der Fraktion A in die Komponenten 1, 2\*, 3 und 4

In eine Säule von 1,5 cm Durchmesser und 100 cm Länge wurden 100 g Kieselgel mit Hexan—Äther (9:1) eingeschlämmt. Es wurden ca. 0,2—0,3 g Substanz auf den Säulenkopf aufgebracht. Als Fließmittel diente Hexan—Äther (800 ml), wobei der Äthergehalt kontinuierlich von 10 auf 30% gesteigert wurde. Die Durchflußgeschwindigkeit soll 10 ml pro 10 Min. betragen.

Die Eluatfraktionen wurden dünnschichtchromatographisch überprüft und diejenigen Fraktionen, die die Komponenten rein enthalten, gesammelt. Die Abb. 2 zeigt, daß die in der Hauptfraktion A enthaltenen Komponenten 1, 2\*, 3, 4 und 5 rein isoliert werden konnten.

#### Auftrennung der Fraktion B in die Komponenten 4, 5, 6\* und 7

Wegen der wiederholt festgestellten Labilität der in Fraktion B enthaltenen peroxydaktiven Komponente 6\* mußte eine möglichst kurze Säule verwendet werden, um eine raschere Trennung zu erreichen, da eine längere Verweildauer der Komponente 6\* in der Adsorptionssäule zu einer Zersetzung der Hydroperoxyde der Komponente 6\* führt.

Wir benutzten eine Säule von 1,5 cm Durchmesser und 50 cm Länge, in die 40 g Kieselgel mit Benzol—Äther (9:1) eingeschlämmt wurden. Es wurden 0,2—0,3 g Substanz der Fraktion B auf die Säule aufgebracht. Als Elutionsmittel dienten 250 ml Benzol—Äther (6:1). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 10 ml pro 10 Min. Aus den dünnschichtchromatographisch geprüften Eluatfraktionen wurden wieder diejenigen gesammelt, die eine der Komponenten rein enthielten. So gelangt man neben den Komponenten 4 und 5, die schon in Hauptfraktion A enthalten sind, zu den reinen Komponenten 6\* und 7. Die Abb. 3 bringt die entsprechenden Photogramme der Dünnschichtplatte.

#### Auftrennung der Hauptfraktion C in die Komponenten 7 und 8\*

In eine Säule von 1,5 cm Durchmesser und 100 cm Länge wurden 100 g Kieselgel mit Hexan—Äther 1:1 eingeschlämmt. Die aufgetragene Menge an Hauptfraktion C betrug ca. 1 g, als Fließmittel dienten 700 ml Hexan—Äther (1:1). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug wiederum 10 ml pro 10 Min. Die Überprüfung der Fraktionen erfolgte, wie schon bei Hauptfraktion A und B beschrieben (Abb. 4).

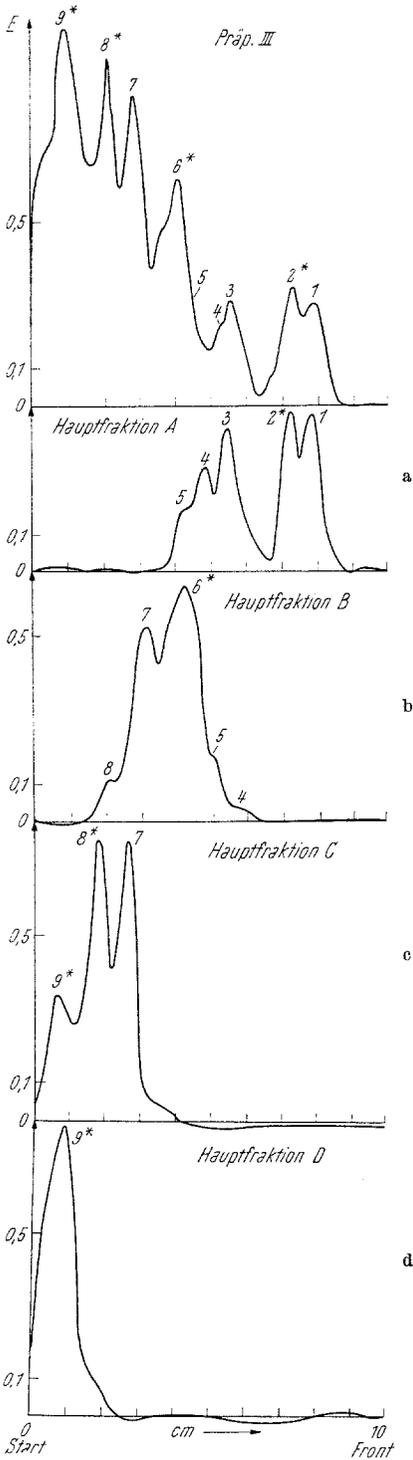
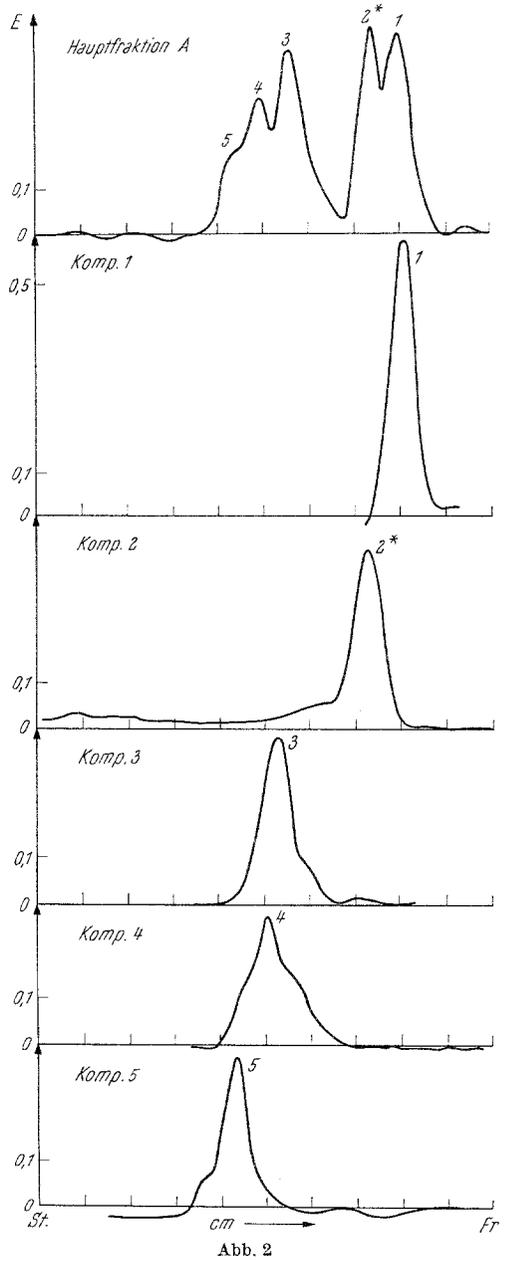


Abb. 1 a—d



### Auftrennung der Fraktion D

Die Hauptfraktion D enthält bei Auftrennung des Mischpräparates nach dem Standardverfahren den Startbereich und läßt nach der Subtrennung mit Hexan—Äther (3:2) nur eine Komponente erkennen, wie in Abb. 1 c dargestellt.

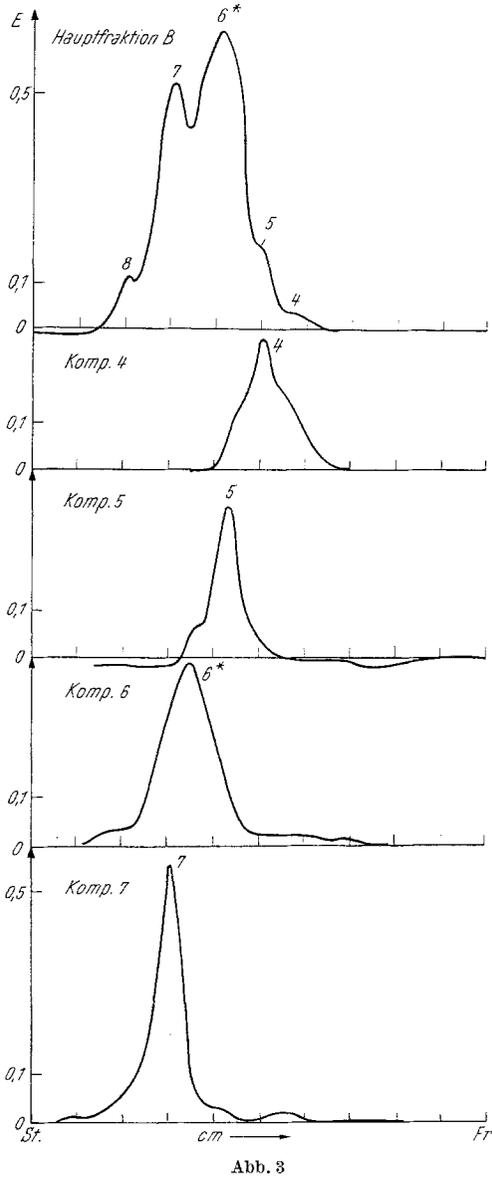


Abb. 3

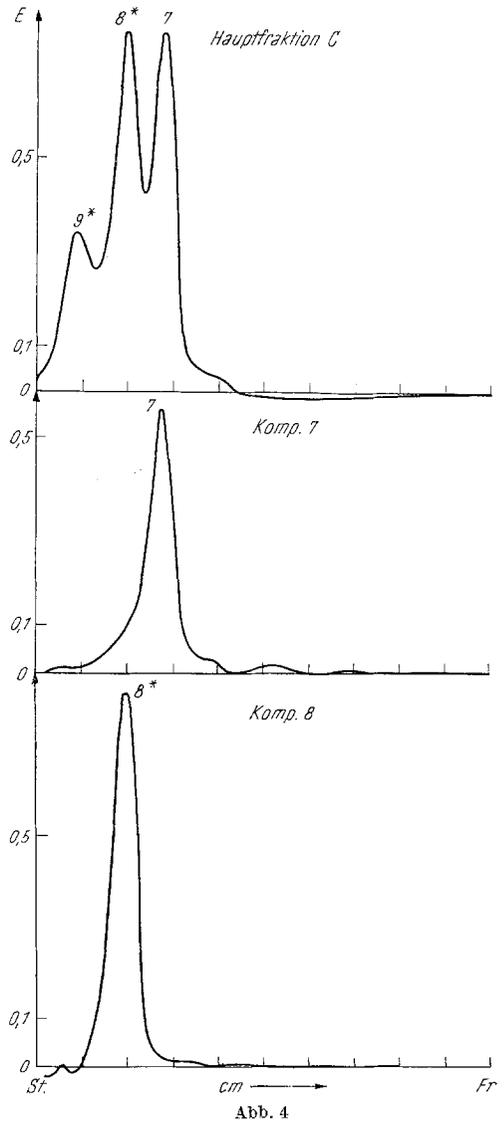


Abb. 4

Damit wäre die Voraussetzung für die chemische Analyse der einzelnen Bestandteile des Mischpräparates LHPO erfüllt, falls die Komponenten 1—9 bereits einheitliche Substanzen sind.

Da die chromatographische Reinheitsprüfung bekanntlich nur dann überzeugende Aussagen über die Einheitlichkeit eines Stoffes liefert, wenn möglichst zahlreiche Fließmittel und Adsorbentien angewendet werden, wurden die Komponenten 1—9 dünn-schichtchromatographisch durch Verwendung verschiedenster Fließmittel (Hexan—Äther, Benzol—Äther, Chloroform—Methanol in verschiedenen Mischungen sowie reines Chloroform, Benzol und reiner Isopropyläther) und verschiedener Adsorbentien (Kieselgel, Aluminiumoxyd, mit Undecan imprägniertes Kieselgel) geprüft. Dabei erwiesen sich die Komponenten 1, 4, 5 und 7 als einheitliche Substanzen, während die Komponenten 2\*, 3, 6\*, 8\* und 9\* in weitere Bestandteile aufzutrennen sind.

So zeigt die Komponente 2\* dünn-schichtchromatographisch, mit Chloroform als Fließmittel, 3 Flecke, darunter einen mit positiver Peroxydreaktion (Abb. 5).

Komponente 3 trennt sich im gleichen Fließmittel ebenfalls in 3 Flecke auf (Abb. 6).

Komponente 6\* gibt mit Chloroform + 2% Methanol ein Chromatogramm, auf dem man 6 Flecke, darunter zwei, die Peroxydreaktion zeigen, erkennt (Abb. 7). Komponente 8\* erscheint dünn-schichtchromatographisch zwar einheitlich, doch konnte durch quantitative UV-Absorptionsspektrometrie das Vorhandensein zweier Komponenten nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich insofern eine besondere Schwierigkeit, als nur die eine Komponente Träger eines UV-Absorptionsmaximums und anfärbbar mit Phosphormolybdänsäure ist, während die zweite keine charakteristische Absorption im UV zeigt und auch mit Phosphormolybdänsäure keinen positiven Farbttest liefert. Außerdem findet sich in Komponente 8\*, wie bereits mitgeteilt, in äußerst geringem Anteil eine als Peroxyd reagierende Substanz, deren säulenchromatographische Isolierung wegen der Labilität dieses Peroxyds derzeit nicht möglich erscheint.

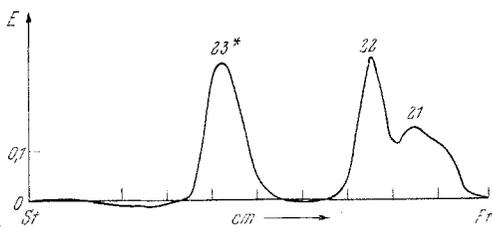


Abb. 5

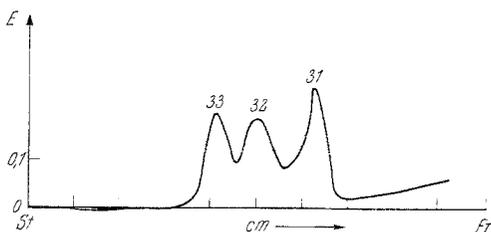


Abb. 6

Die Komponente 9\* trennt sich, wie erwartet, bei Verwendung von Fließmitteln höherer Polarität (Hexan—Äther 1:9) in mehrere Flecke auf, die zum Teil positive Peroxydreaktionen zeigen.

Ob die in Abb. 8 erkennbaren 7 Peaks der tatsächlichen Anzahl der Substanzen in Komponente 9\* entsprechen, kann, da nähere Untersuchungen noch ausstehen, derzeit nicht mit Sicherheit gesagt werden.

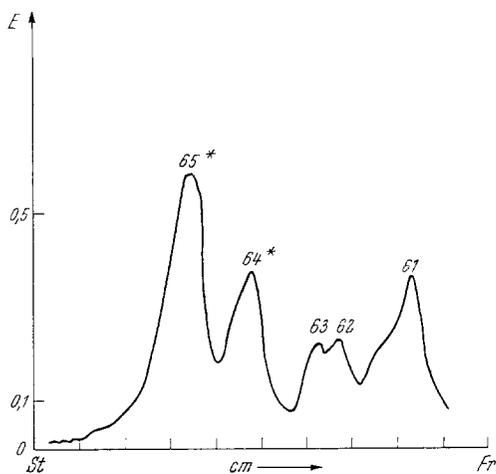


Abb. 7

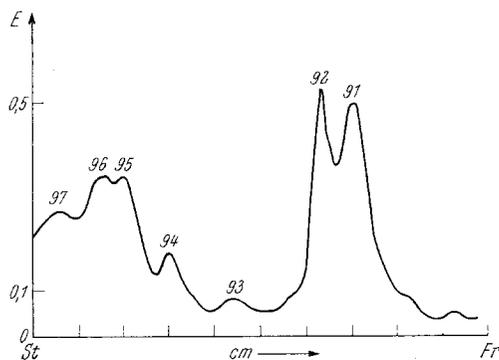


Abb. 8

In der Tab. 1 ist die nach den beiden Trennmethoden a und b mögliche, säulenchromatographische, präparative Auftrennung des Mischpräparates III in Komponenten übersichtlich zusammengestellt. In Spalte 4 sind zusätzlich die ungefähren prozentuellen Anteile der Komponenten 1—9 am Gesamtpräparat angegeben.

Die Prozentanteile der einzelnen Komponenten ergeben nicht genau den Prozentanteil der Hauptfraktionen; dies begründet sich damit, daß sich, wie in der Tabelle angedeutet, die Hauptfraktionen A, B und C bis zu einem gewissen Grad überschneiden.

Es darf abschließend vermerkt werden, daß es sich bei den in Tab. 1, Spalte 3 angeführten Substanzen tatsächlich um

nicht weiter trennbare, einheitliche Verbindungen handelt, deren Analysendaten und biologische Eigenschaften in den folgenden Arbeiten dieser Reihe veröffentlicht werden sollen.

Unsere Untersuchungen wurden teilweise von einer Forschungsbeförderung CA 06617-01 PC des Public Health Service, National Cancer Institute, unterstützt.