

# *Acta Medica Okayama*

---

*Volume 7, Issue 3*

1942

*Article 3*

JULI 1943

---

## Über die Oxydation der Cholsaure und der Trioxy-isosterocholensaure in ihre Dehydrosaure bei der Faulnis der Meerschweinchenleber.

Yasuya Okasaki\*

Kanzi Iwaki†

\*Okayama University,

†Okayama University,

Aus dem Biochemischen Institut der Med. Fakultät Okayama  
(Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu).

**Über die Oxydation der Cholsäure und der Trioxy-isosterolcholsäure in ihre Dehydrosäure bei der Fäulnis der Meerschweinchenleber.**

Von

**Yasuya Okasaki und Kanzi Iwaki.**

*Eingegangen am 14. September 1942.*

Als erster hat *F. Mylius* im Jahre 1886 angegeben, daß die Cholsäure bei der Fäulnis der Pankreasdrüse in eine um einen Sauerstoff ärmere Gallensäure, Desoxycholsäure reduziert wird. Später haben *Wieland* und *Sorge* (1916) den *Mylius*schen Fäulnisversuch mit absolut reiner von Desoxycholsäure ganz freier Cholsäure einmal wiederholt. Dabei wurde keine Desoxycholsäure gefunden, jedoch von ihnen erklärt, daß trotz des Misserfolges der biologische Übergang der Cholsäure in Desoxycholsäure nicht unmöglich sei. Dann gelang es im Jahre 1940 *T. Mori* aus dem Fäulnisprodukte mit reiner Cholsäure und Pankreasdrüse Desoxycholsäure zu gewinnen. Bereits *Sasaki* (1940) hat gefunden, daß die Cholsäure bei der Bebrütung im Meerschweinchenleber-Schnitt in 3.7.12-Triketocholansäure oxydiert wird, obwohl dieser Versuch nicht bei Fäulnis ausgeführt wurde. Ebenfalls hat vor kurzem *T. Kanemitsu* (1942) beobachtet, daß 3.7-Dioxycholansäure bei der Fäulnis der Meerschweinchenleber zu 3-Oxy-7-ketocholansäure oxydiert wird. Die obenerwähnten Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Cholsäure leicht in Oxyketosäure oder Dehydrosäure oxydiert und dann weiter in die anderen sauerstoffärmeren Gallensäuren reduziert wird, wie es im Organismus der Fall ist.

Höhere Gallensäuren wie z. B. Trioxy-bufosterolcholsäure werden im Meerschweinchenorganismus in Cholsäure und weiter in Desoxycholsäure aboxydiert, was von *Iwaki* (1941) bereits festgestellt wurde.

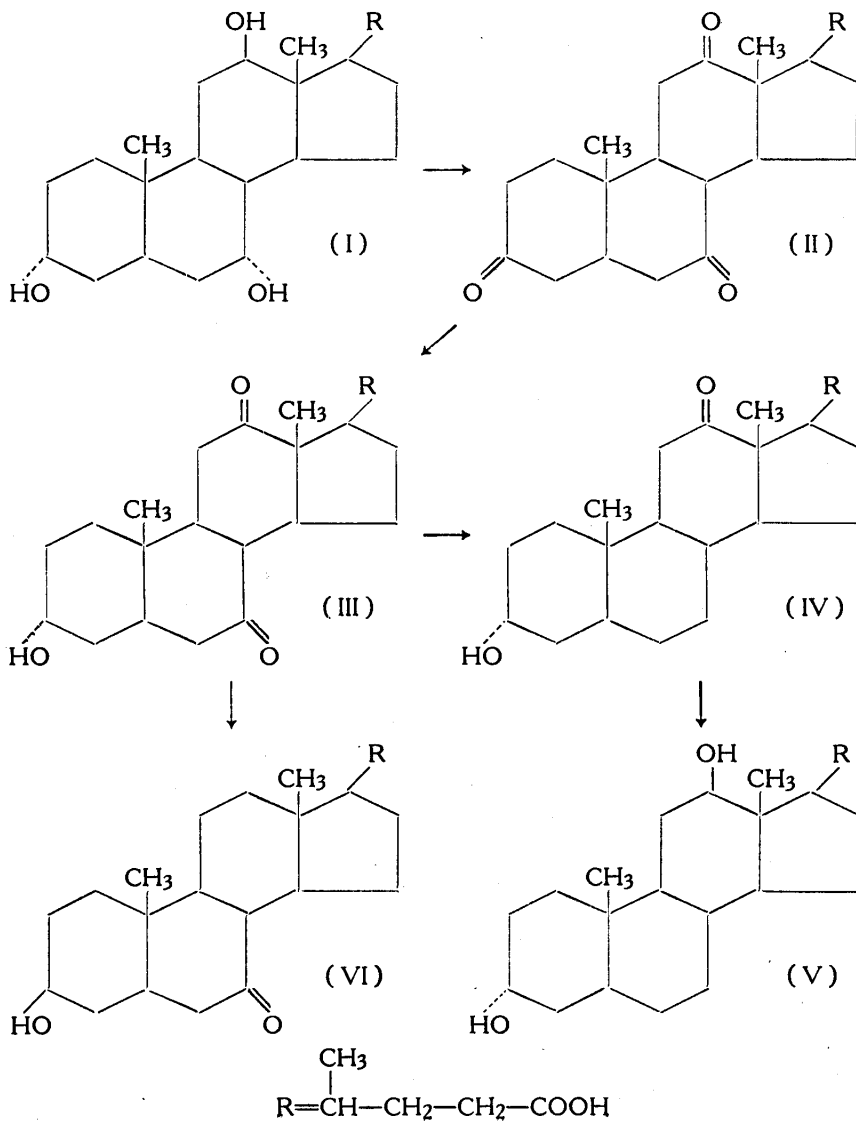
Um den Übergangsmechanismus der kohlenstoffreicheren Gallensäure, die als Zwischenstufe zu gewöhnlichen Gallensäuren von C<sub>24</sub> betrachtet wird, in Cholsäure oder weiter in Desoxycholsäure

Y. Okasaki u. K. Iwaki: Üb. d. Oxydation d. Cholsäure u. d. Trioxy- usw. 211

festzustellen wurde das Schicksal der Trioxy-isosterocholensäure  $C_{28}H_{46}O_5$  bzw. der Cholsäure bei der Fäulnis der Meerschweinchenleber untersucht und gefunden, daß aus dem Fäulnisprodukte Tri-keto-isosterocholensäure, Dehydrocholsäure und Desoxycholsäure in ziemlich guter Ausbeute erhalten wurden.

Bei der Fäulnis der Meerschweinchenleber verhalten sich die Trioxy-isosterocholensäure und die Cholsäure genau in gleicher Weise.

Beim Versuch mit Cholsäure wurde gefunden, daß außer Dehydrocholsäure und Desoxycholsäure eine Art von Monoxy-monoketo-cholensäure, vielleicht  $\beta$ -3-Oxy-7-ketocholensäure gebildet wurde.



212 Y. Okasaki u. K. Iwaki: Üb. d. Oxydation d. Cholsäure u. d. Trioxy-isostero

Die Bildung der Desoxycholsäure (V) aus Cholsäure (I) bei der Fäulnis geht also erst über Dehydrocholsäure (II), dann über Reduktodehydrocholsäure (III) weiter über Oxyketosäuren (IV u. VI) vor sich, bis sie aus letzteren als Desoxycholsäure (V) oder eine  $\beta$ -Chenodesoxycholsäure gebildet wird.

## Beschreibung der Versuche.

### 1. Bei Trioxy-isosterocholensäure.

3,9 g Trioxy-isosterocholensäure vom Schmelzpunkt  $227^{\circ}$  wurden in berechneter Menge von 10/N Natronlauge gelöst und mit sterilisiertem destilliertem Wasser verdünnt, bis die Lösung 3% davon enthielt. 130 cc der Lösung wurden mit 240 g zerkleinerter frischer Meerschweinchenleber, zusammen mit 875 cc Phosphatpuffer (pH = 7,4) und mit 495 cc *Rock'scher* Lösung in den sterilisierten Kolben gebracht und 50 Tage lang im Brutschrank bei  $37-38^{\circ}$  aufbewahrt, wobei täglich einige Male gut geschüttelt wurde. Diese Reaktionslösung wurde unter Zusatz von Krystallsoda schwach alkalisch gemacht und filtriert. Das Filtrat wurde auf dem Wasserbade abgedampft und im Exsikkator gut getrocknet. Dabei wurde eine schwarzbraune Masse von 45 g erhalten und mit absolutem Alkohol unter Erwärmung auf dem Wasserbade 3 Stunden lang extrahiert. Der Alkoholextrakt wurde durch Abdampfen z. T. vom Alkohol befreit, mit Wasser verdünnt und weiter vom Alkohol befreit. Die dabei zurückgebliebene schwarzbraune Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther ausgeschüttelt, um die fettige Substanz zu entfernen. Die dabei abgeschiedene Fällung wurde wieder in 5%iger Kalilauge gelöst, auf dem Wasserbade von Lösungsmitteln befreit und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Fällung wurde abgesaugt, gut getrocknet und mit Petroläther und Äther abwechselnd abermals digeriert. Der Ätherauszug wurde nach dem Verdampfen wieder in Petroläther digeriert und diese Behandlung einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu beseitigen. Aus diesem Ätherauszug schieden sich beim Verdunsten die Äthers weisse Krystalle ab. Diese wurden aus Methanol umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt  $227^{\circ}$ . Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Trioxy-isosterocholensäure. Ausbeute 1,2 g.

Methylester der Säure.

30 mg der Säure wurden in Methanol mit ätherischer Diazomethanlösung verestert, der Ester wurde aus Methanol umkrystallisiert.

cholensäure in ihre Dehydrosäure b. d. Fäulnis d. Meerschweinchenleber. 213

Prismen vom Schmelzpunkt  $220^{\circ}$ . Bei der Mischprobe zeigte er mit reinem Trioxy-isosterocholensäuremethylester keine Schmelzpunktdepression.

3,450 mg Subst.: 9,220 mg  $\text{CO}_2$ , 3,115 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_5$	Ber.	C 73,05 %	H 10,16 %
	Gef.	„ 72,89 %	„ 10,10 %

Das von den Trioxy-isosterocholensäurekrystallen abfiltrierte ätherische Filtrat wurde verdampft und im Exsikkator völlig getrocknet. Der Rückstand wurde mit Essigäther erschöpfend extrahiert, der Essigätherauszug gut getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde in Petroläther abermals digeriert, dann mit getrocknetem Äther behandelt und der Ätherauszug nach dem Verdampfen wieder in Petroläther digeriert. Diese Behandlung wurde nochmals wiederholt, um das Fett und den Farbstoff völlig zu beseitigen. Dabei wurde eine gelbweiße Masse erhalten. Diese Substanz wurde in Essigäther gelöst und bis zur beginnenden Krystallisation eingengt. Die dabei erhaltenen Krystalle wurden aus Eisessig mehrmals umkrystallisiert. Blättchen vom Schmelzpunkt  $241 - 242^{\circ}$ . Bei *Liebermannscher* Reaktion zeigten sie eine schwach gelbe Farbe. Ausbeute 60 mg. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Triketo-isosterocholensäure.

4,235 mg Subst.: 11,400 mg  $\text{CO}_2$ , 3,250 mg  $\text{H}_2\text{O}$ .

$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_5$	Ber.	C 73,63 %	H 8,84 %
	Gef.	„ 73,41 %	„ 8,59 %

## 2. Bei Cholsäure.

80 cc einer 5%igen Natriumcholatlösung (4 g Cholsäure) wurden mit 240 g frisch zerkleinerter Meerschweinchenleber, zusammen mit 930 cc Phosphatpufferlösung von  $\text{pH} = 7,8$  und mit 490 cc *Rock-*scher Lösung versetzt und 90 Tage lang im Brutschrank bei  $37^{\circ}$  stehen gelassen. Folgende vier Versuche wurden vorgenommen.

### a) Cholsäure.

Das Reaktionsgemisch wurde unter schwacher Alkalisierung durch Zusatz einer 5%igen Natriumkarbonatlösung auf dem Wasserbade zur Trockne abgedampft. Der schwarzbraune Rückstand wurde mit absolutem Alkohol extrahiert, mit Kalilauge versetzt, bis die Lösung 5 % davon enthielt und dann 3 Stunden lang hydrolysiert. Das braune Hydrolysat wurde mit einer größeren Menge von Wasser verdünnt, unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther geschüttelt, um das Fett zu beseitigen, und abfiltriert. Das Filtrat wurde unter Zusatz einer Sodalösung schwach alkalisch gemacht und auf dem Wasserbade durch Erwärmen von Alkohol und

Petroläther befreit. Dann wurde die Lösung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt.

Die Fällung wurde nach dem Trocknen aus Essigäther umkrystallisiert. Ausbeute 7 g. Die Substanz wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 10%igen Chlorbariumlösung ausgefällt und nach 12 Stunden abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die beiden Fällungen wurden nach dem Trocknen in Essigäther gelöst und durch Einengen der Lösung wurden Nadelkrystalle gewonnen. Ausbeute 3 g. Aus Alkohol wurden die Krystalle umkrystallisiert. Oktäder vom Schmelzpunkt 198°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Cholsäure.

Aus der Essigäthermutterlauge wurden weiter nach dem Trocknen und nach Umkrystallisation aus absolutem Äther weiße Krystalle gewonnen, die aus Azeton-Wasser umkrystallisiert wurden. Nadeln vom Schmelzpunkt 198°. Ausbeute 0,64 g. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Cholsäure.

4,055 mg Subst. : 10,505 mg CO<sub>2</sub>, 3,520 mg H<sub>2</sub>O.

C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>5</sub>	Ber.	C 70,53%	H 9,87%
	Gef.	„ 70,63%	„ 9,71%

#### b) Dehydrocholsäure.

Die Essigäthermutterlauge wurde abgedampft, getrocknet und in absolutem Äther gelöst. Der orangegelbe in absolutem Äther unlösliche ölige Teil wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure gefällt, die hierbei erhaltene gelbe Fällung nach dem Trocknen in Essigäther gelöst und die Lösung bei Zimmertemperatur verdunsten gelassen. Die dabei abgeschiedenen feinen Nadelkrystalle wurden aus Alkohol umkrystallisiert. Schmelzpunkt 236°. Ausbeute 70 mg. Die Krystalle zeigten weder *Mylius*-sche noch *Hammarstensche*, wohl aber *Jaffesche* Reaktion. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Dehydrocholsäure.

3,370 mg subst. : 8,850 mg CO<sub>2</sub>, 2,560 mg H<sub>2</sub>O.

C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Ber.	C 71,59%	H 8,51%
	Gef.	„ 71,62%	„ 8,44%

#### c) Desoxycholsäure.

Die Bariumsalzfällung wurde in 5%iger Sodalösung 2 Stunden lang auf dem Wasserbade erwärmt und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert und von der dabei abgeschiedenen gelben Fällung abfiltriert.

Die Fällung wurde in 5%iger Kalilauge gelöst, 5 Stunden lang auf dem Wasserbade erwärmt und dann abfiltriert. Das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther extrahiert. Die Ätherlösung wurde im Zimmer verdunsten gelassen. Die hier-

cholensäure in ihre Dehydrosäure b. d. Fäulnis d. Meerschweinchenleber. 215

bei abgeschiedenen Krystalle wurden aus Eisessig umkrystallisiert Die Krystalle schmolzen bei 145° und zeigten keine Schmelzpunktdepression mit reiner Essig-choleinsäure.

3,870 mg subst. : 9,785 mg CO<sub>2</sub>, 3,430 mg H<sub>2</sub>O.

C <sub>24</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub> .CH <sub>3</sub> COOH	Ber. C 68,97%	H 9,84%
	Gef. „ 68,95%	„ 9,92%

Diese Säure wurde in üblicher Weise durch Kochen in Ameisensäurelösung verestert. Der Esterr schmolz bei 192°. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformyl-desoxycholsäure.

3,640 mg Subst. : 9,290 mg CO<sub>2</sub>, 2,970 mg H<sub>2</sub>O.

C <sub>26</sub> H <sub>40</sub> O <sub>6</sub>	Ber. C 69,64%	H 8,93%
	Gef. „ 69,61%	„ 9,12%

d) Monoxy-monoketocholansäure C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>.

Das von der Desoxycholsäurefraktion abgetrennte Filtrat wurde zur Trockne abgedampft. Die braune ölige Masse wurde wieder in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und mit einer 5%igen Chlorbariumlösung gefällt. Die hierbei erhaltene gelbe Fällung wurde abfiltriert und das Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther ausgeschüttelt. Die Ätherlösung wurde im Zimmer verdunsten gelassen. Die hier abgeschiedenen Krystalle schmolzen bei 185–188°. Ausbeute 30 mg. Beim Umkrystallisieren aus Essigäther stieg der Schmelzpunkt auf 194–196°. Glänzende rhombische Tafeln.

Die Säure zeigte weder *Hammarstensche*, *Myliussche* noch *Jaffesche* Reaktion. Bei *Liebermannscher* Reaktion zeigte sie eine schwach orangegelbe Farbe mit sehr schwacher Fluoreszenz.

Bei der Mischprobe schmolz die Säure mit Essigcholeinsäure (188°) bei 175–180°, mit 3-Oxy-7-ketocholansäure (200°) bei 178–180°. Auch zeigte die Säure mit  $\alpha$ -3-Oxy-12-ketocholansäure (165°),  $\beta$ -3-Oxy-12-ketocholansäure (218–220°) und mit Weylandsäure (164–165°) eine Schmelzpunktdepression.

Die neue Monoxy-monoketosäure stimmt aber nicht mit irgend-einer bisher bekannten in der Literatur angegebenen Monoxy-monoketocholansäure überein und zwar dürfte sie eine isomere  $\beta$ -3-Oxy-7-ketocholansäure sein.

3,570, 3,450 mg Subst. : 9,640, 9,340 mg CO<sub>2</sub>, 3,170, 3,045 mg H<sub>2</sub>O.

C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	Ber. C 73,79%	H 9,81%
	Gef. „ 73,64%, 73,84%	„ 9,93%, 9,80%

### Litaratur.

*Kanemitsu, T.*, noch nicht publiziert. — *Mori, T.*, J. of Bioch., 31, 467, 1940. — *Mylius, F.*, Ber. Chem. Ges., 19, 377, 1886. — *Sasaki, T.*, J. of Bioch., 32, 81 1940. — *Wieland, H.*, u. *Sorge, H.*, Z. Physiol. Chem., 98, 59, 1916.