

Acta Medica Okayama

Volume 6, Issue 4

1938

Article 6

JUNI 1941

Photochemische Eigenschaften der Gallensaure : IV. Bestrahlung der 12-Keto-7-cholensaure mit Ultraviolettstrahlen und ihre biochemische Untersuchung

Tai Sihak Sihn*

*Okayama University,

Copyright ©1999 OKAYAMA UNIVERSITY MEDICAL SCHOOL. All rights reserved.

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

**Photochemische Eigenschaften der Gallensäure IV.
Bestrahlung der 12-Keto-7-cholensäure mit Ultraviolett-
strahlen und ihre biochemische
Untersuchung**

Von

Tai Sihk Sihn.

Eingegangen am 21. Mai 1940.

Es ist höchstwahrscheinlich, daß die Gallensäure aus Sterinen von 27 oder 28 Kohlenstoffatomen gebildet wird, da diese Sterine im Tierorganismus vorkommen und die als Übergangsstufen zwischen Ergosterin und 7-Dehydrocholesterin und der gewöhnlichen Gallensäure zu betrachtenden höheren Gallensäuren in verschiedenen Gallen vorgefunden wurden. Diese Gallensäuren haben die gleiche Kohlenstoffzahl wie das Ergosterin oder 7-Dehydrocholesterin und sind ihnen konstitutionell sehr ähnlich. In der Galle des „Gi-Gi“ Fisches¹⁾ wurde Tetraoxy-norsterocholansäure $C_{27}H_{46}O_6$, in der von Kröten²⁾ Tetraoxybufostan $C_{27}H_{48}O_4$ und in der von Haifischen³⁾ α -Scymnol $C_{27}H_{46}O_5$ vorgefunden. In der Krötengalle wurden Trioxy-sterocholansäure und Trioxy-isosterocholansäure⁴⁾ $C_{28}H_{46}O_5$ und Pentaoxybufostan $C_{28}H_{50}O_5$ ⁵⁾ vorgefunden.

Als Bedingung für die Gallensäurebildung aus Sterinen muß eine Verschiebung und Hydratisierung der Doppelbindung im Sterinmolekül stattfinden. In dieser Versuchsrichtung wurde bereits festgestellt, daß die Apocholsäure⁶⁾, 3.12-Dioxy- $\Delta^{8,14}$ -cholensäure und die Dioxy-cholensäure⁶⁾, 3.12-Dioxy- $\Delta^{7,8}$ -cholensäure durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht ineinander übergehen, und daß die Apocholsäure⁷⁾ im Krötenorganismus in Dioxycholensäure verwandelt wird, was alles zeigt, daß die Doppelbindung des Gallensäuremoleküls biologisch und biochemisch verschoben worden sein dürfte. Um dies weiter genau zu studieren, wurde der Einfluß der Ultraviolettstrahlen auf 12-Keto-7-cholensäure und zugleich einige ihrer biochemischen Eigenschaften untersucht. Diese Gallensäure wurde aus Cholsäure über 7-Oxy-12-ketocholansäure⁸⁾ erhalten. Bei der Be-

strahlung einer Lösung von 12-Keto-7-cholensäure in Chloroform ging die Säure unter Veränderung ihrer optischen Aktivität (Tabelle 1) höchstwahrscheinlich in eine gegen katalytisch erregten Wasserstoff beständige, nicht krystallisierbare, ungesättigte, der Apocholsäure ähnliche Säure über.

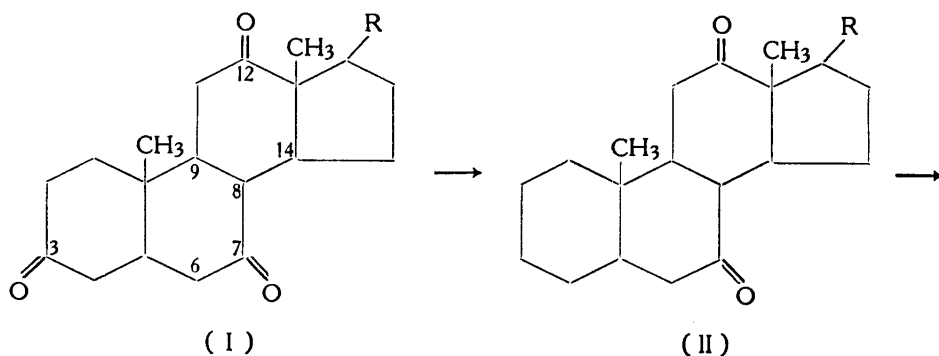
Tabelle 1.

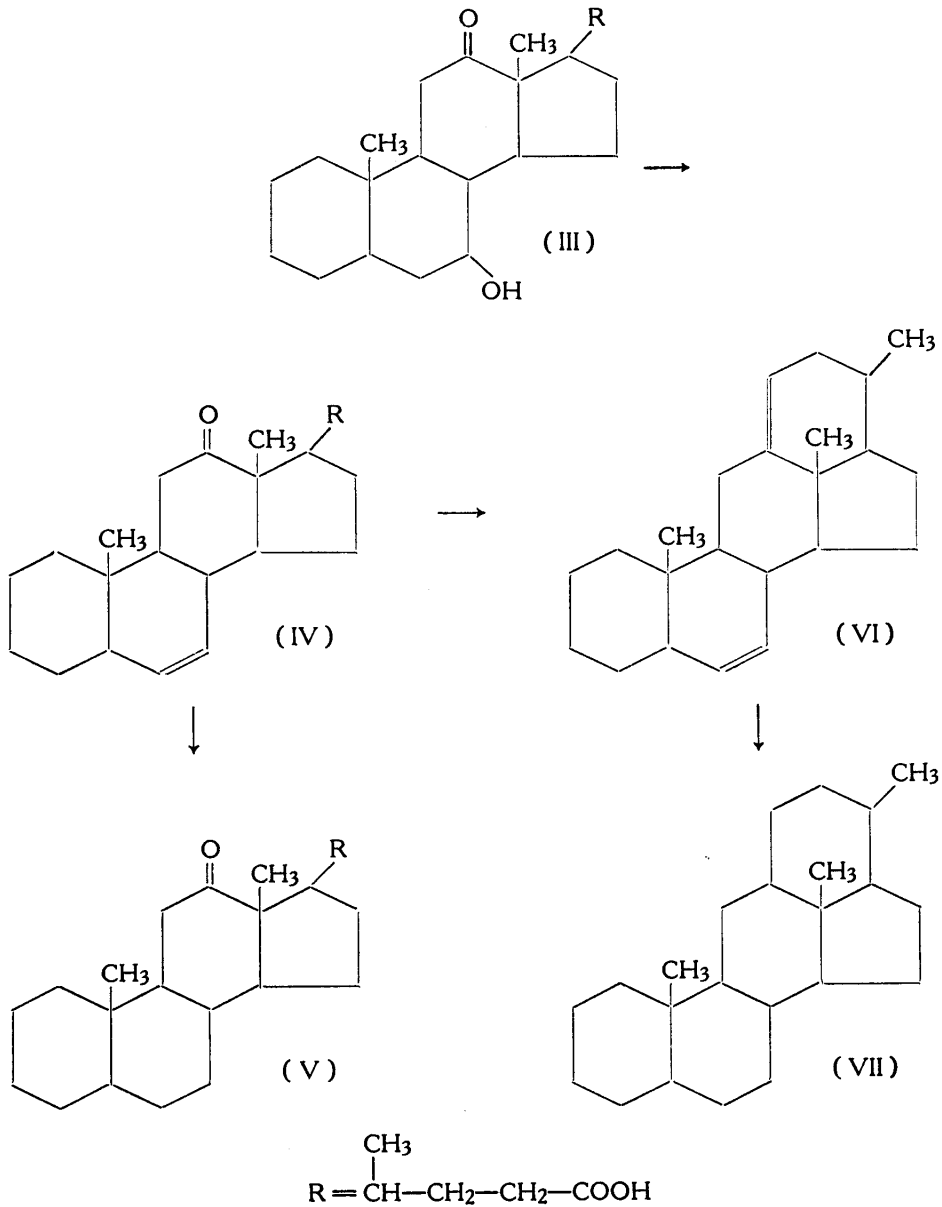
Bestrahlungsdauer in Min.	0	30	60	90	120	150
α_D^{20}	+62.5	+59.5	+59.2	+59	+72.5	+74

Die neue Säure wurde mit *Brockmannschem* Aluminiumoxyd chromatographisch als obere 1- und 2-Fraktion, (jedoch nicht krystallinisch) erhalten. Dies zeigt, daß die Umwandlung der 12-Keto-7-cholensäure in eine unter veränderter optischer Aktivität nicht hydrierbare Säure auf eine Verschiebung der Doppelbindung in der Stellung C₇-C₆ oder C₇-C₈ der 12-Keto-3-cholensäure in der Stellung C₈-C₉ oder C₈-C₁₄ der neuen Säure hinweist.

Bei der haemolytischen und die Pankreaslipase fördernden Wirkung verhält sich die 12-Keto-7-cholensäure fast genau wie die Cholsäure, während die die Oberflächenspannung herabsetzende Wirkung der Cholsäure etwas stärker ist als die der 12-Keto-7-cholensäure.

Aus der 12-Keto-7-oxy-cholensäure (III), die nach *Wieland* u. *Dane*⁸⁾ aus der durch partielle Reduktion von Dehydrocholsäure (I) erhaltenen 7,12-Diketocholensäure (II) entsteht, wurde durch Vakuumdestillation eine 12-Keto-7-cholensäure (IV) vom Schmelzpunkt 205° und $\alpha_D^{20} = +62.84^\circ$ erhalten, wobei sich als Nebenprodukt ein Dehydronorcholadien⁹⁾ (VI) vom Schmelzpunkt 204-205° ergab, welches in Dehydronorcholan (VII) hydriert wird. Die 12-Keto-7-cholensäure wird auch durch katalytische Hydrierung zu 12-Keto-cholensäure (V) reduziert.





Beschreibung der Versuche.

A. Versuchsmaterialien.

1. 12-Keto-7-oxycholansäure⁸⁾.

Aus 300 g Dehydrocholsäure (bereitet aus 750 g Cholsäure) wurden unter Reduktion nach *Clemmensen* 75 g 7.12-Diketochocholsäure als Äthylester erhalten, aus dem durch Hydrolyse und weiter durch

partielle katalytische Hydrierung 35 g 12-Keto-7-oxycholensäure vom Schmelzpunkt 176° gewonnen wurden.

2. 12-Keto-7-cholensäure.

3.5 g 12-Keto-7-oxycholensäure wurden im Schwertkolben bei 360° der Vakuumdestillation unterworfen und das Destillationsprodukt erst aus Alkohol und Wasser, dann aus absolutem Alkohol umkrystallisiert. Schuppen oder Prismen vom Schmelzpunkt 205°. Ausbeute 1.5 g. Die Säure ist in Äther, Chloroform, Eisessig und Essigester leicht löslich, aber schwer in Alkohol. Sie addiert Brom, ist in Alkali schwer und ihr Natriumsalz in Wasser unlöslich. *Liebermannsche* Reaktion: rot-braun.

Spezifische Drehung: 0.0557 g Subst.: 10 cc absol. Alkohol, 2 dm,
 $\alpha = +0.7$, $[\alpha]_D^{20} = +62.84^\circ$.

5.121, 5.015 mg Subst.: 14.514, 14.210 mg CO₂, 4.411, 4.481 mg H₂O.
 $C_{24}H_{36}O_3$ Ber. C 77.37 H 9.75
 Gef. „ 77.30, 77.28 „ 9.64, 9.70.

3. 12-Ketocholensäure.

0.5 g 12-Keto-7-cholensäure wurden in 10 cc Eisessig mit 0.05 g Platinoxid unter Einleitung von Wasserstoff 20 Minuten lang geschüttelt, das Reaktionsgemisch vom Platinoxid abfiltriert und unter Zusatz von Wasser gefällt. Die Fällung wurde aus Alkohol umkrystallisiert. Feine zu Rosetten vereinigte Nadeln vom Schmelzpunkt 186–187°. Keine Schmelzpunktdepression mit einer nach *Wieland*¹⁰⁾ bereiteten 12-Ketocholensäure. Ausbeute 0.3 g.

4.216, 4.152 mg Subst.: 11.878, 11.708 mg CO₂, 3.842, 3.792 mg H₂O.
 $C_{24}H_{38}O_3$ Ber. C 76.94 H 10.23
 Gef. „ 76.84, 76.91 „ 10.20, 10.22.

4. Dehydro-norcholadien⁹⁾ aus 12-Keto-7-cholensäure.

35 g 12-Keto-7-oxycholensäure wurden 10 mal im Vakuum bei 360° destilliert. Aus dem Destillat wurden im ganzen 15 g 12-Keto-7-cholensäure gewonnen. Aus dem von dieser Säure getrennten Filtrat wurden durch Abdampfen des Lösungsmittels 1.5 g rot-braune Masse erhalten. Diese Masse wurde in Äther aufgenommen und mit einer 5%igen Sodalösung geschüttelt, um die Säure zu beseitigen. Der Ätherauszug wurde nach dem Abdampfen des Äthers wieder in absolutem Alkohol gelöst und ca. einen Monat lang im Eisschrank stehen gelassen. Die dabei abgeschiedenen Krystalle wurden erst aus absolutem Alkohol, dann aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 204–205°. Ausbeute 0.15 g. Die Krystalle sind in Alkalilauge unlöslich und addieren Brom. *Liebermannsche* Reaktion: schwach-gelb.

3.110 mg Subst.:	10.138 mg CO ₂ ,	3.074 mg H ₂ O.
C ₂₃ H ₃₄	Ber. C 88.97	H 11.04
Gef. „	88.91	„ 11.06.

5. *Dehydro-norcholan.*

0.03 g Dehydro-norcholadien wurden in 5 cc Eisessig gelöst, mit 30 mg Platinoxid unter Wasserstoff geschüttelt, vom Platinoxid abfiltriert und unter Zusatz von Wasser gefällt.

Die Fällung wurde aus Eisessig umkristallisiert. Farblose Blättchen vom Schmelzpunkt 66–67°. Die Substanz ist gegen Permanganat gesättigt und addiert nicht mehr Brom. Ausbeute 0.02 g.

3.101 mg Subst.:	9.987 mg CO ₂ ,	3.355 mg H ₂ O.
C ₂₃ H ₃₈	Ber. C 87.90	H 12.10
Gef. „	87.86	„ 12.11.

B. *Biochemische Untersuchung der 12-Keto-7-cholensäure.*1. *Haemolytische Wirkung der 12-Keto-7-cholensäure.*

Die Cholsäure und 12-Keto-7-cholensäure wurden je als Natriumsalz in 0.9%iger Kochsalzlösung gelöst und in einer Konzentration von $\frac{1}{37.5} - \frac{1}{1200}$ g/cc zum Versuch verwendet. Von diesen Lösungen wurden je 2 cc in kleine Reagensgläser gefüllt und jedem Röhrchen 1 cc Blutkörperchensuspension von Rind und Ziege zugefügt. Die Lösung wurde eine Stunde lang im Brutschrank und dann eine Nacht im Eisschrank gehalten; die Ablesung erfolgte erst am folgenden Morgen. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2.

Konzentration d. Gallensäure	1 : 37.5	1 : 75	1 : 150	1 : 300	1 : 600	1 : 1200	Blut
Cholsäure	++	++	+	+	+	—	Z
	++	++	+	+	±	—	R
12-Keto-7-cholensäure	++	++	+	+	—	—	Z
	++	++	+	±	—	—	R

++ vollständig, + teilweise, ± spurweise, — keine, Z = Ziege, R = Rind.

2. *Lipasefördernde Wirkung.*

Der Lipaseauszug wurde aus frischen Rinderpankreasdrüsen nach der Vorschrift von Kaziro u. Tsuji¹⁾ hergestellt und unter 2-facher Verdünnung mit Wasser zur Verwendung gebracht. Die

Cholsäure und 12-Keto-7-cholensäure wurden je als 0.04%ige Natriumsalzlösung verwendet. Die Ölemulsion wurde nach *Kanitz*¹²⁾ hergestellt und das Digestionsgut aller Versuche mit 10 cc eines Phosphatgemisches von pH=7.8 versetzt.

Die Versuchsbedingungen finden sich in der folgenden Tabelle 3.

Tabelle 3.

Versuchsnummer Lösungen cc	I	II	III	IV
Puffer	10	10	10	10
Lipaselösung	3	3	3	3
Ölemulsion	5	5	5	5
Gallensäurelösung	—	3	6	12
Wasser	12	9	6	0
Toluol	0.5	0.5	0.5	0.5

Jedes dieser Digestionsgemische (I-IV) wurde bei 37-38° 18 Stunden lang im Brutschrank gehalten. Die dabei abgespaltene Fettsäure wurde mit $\frac{n}{10}$ NaOH unter Alkoholzusatz (5 cc) titrimetrisch doppelt bestimmt (Phenolphthalein) und die dabei verbrauchte Alkalimenge in cc angegeben.

Tabelle 4.

Gallensäuregehalt % Arten	0	0.04	0.08	0.16
Cholsäure	1.51	1.55	1.62	1.66
	1.45	1.56	1.60	1.68
12-Keto-7-cholensäure	1.40	1.43	1.48	1.62
	1.41	1.42	1.46	1.61

3. Stalagmometrische Untersuchung.

Die die Oberflächenspannung herabsetzende Wirkung der Cholsäure und der 12-Keto-7-cholensäure wurde in einer Konzentration von $\frac{1}{25} - \frac{1}{400}$ g/cc bei 19-20° stalagmometrisch ermittelt. Die gefundenen Werte finden sich in der folgenden Tabelle 5.

Tabelle 5.

Konzentration g/cc Gallensäure	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 400
Cholsäure	140.3	139.1	138.2	136.0
12-Keto-7-cholensäure	136.5	135.0	132.5	126.1
Dest. Wasser	100.0	100.0	100.0	100.0

4. Bestrahlung der 12-Keto-7-cholensäure.

Der Methylester wurde in üblicher Weise mit Diazomethan bereitet und aus Methanol umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 83–84°. Sie lösen sich leicht in Alkohol, Methanol, Eisessig, Essigester, Chloroform und Äther.

Spezifische Drehung: 0.1 g Subst. in 10 cc Chloroform, 2 dm,
 $\alpha = +1.25$, $[\alpha]_D^{20} = +62.5^\circ$.

5.010 mg Subst: 14.262 mg CO₂, 4.432 mg H₂O.

C25H38O3 Ber. C 77.66 H 9.91
 Gef. „ 77.67 „ 9.90.

1.3 g Ester wurden in Chloroform als 1%ige Lösung gelöst und die Lösung im Quarzrohr in 25 cc Entfernung 20 Stunden lang mit der Quarzlampe von *Hanau* (100 Volt und 75 Amp.) bestrahlt. Erst nach 20 Minuten wurde die Lösung schwach gelblich. Die spezifische Drehung der bestrahlten Lösung wurde bei 27–28° nach ½, 1, 1½, 2 und 2½ Stunden bestimmt. Dabei nimmt sie mit der Zeit allmählich ab, um nach 2 Stunden wieder zuzunehmen, wie in Tabelle I angegeben ist.

Die bestrahlte Chloroformlösung wurde im Vakuum abgedampft. Der bräunlichrote ölige Rückstand war in Äther ziemlich leicht, aber in Alkohol und Methanol schwer löslich und aus diesen Lösungsmitteln nicht krystallisierbar. So wurde er mit einer 5%igen alkoholischen Kalilauge 2 Stunden lang verseift, wobei 2 Fraktionen ein leicht und ein schwer hydrolysierbarer Teil je als ein Öl erhalten wurden. Aus dem ersten wurde durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure und durch Umkrystallisation aus Alkohol wieder eine unveränderte 12-Keto-7-cholensäure erhalten. Ausbeute 0.4 g. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner 12-Keto-7-cholensäure.

Aus dem schwerhydrolysierbaren Teil wurde durch nochmalige zweistündige Hydrolyse mit 5%iger Kalilauge und Ansäuern eine schwerkrystallisierbare Substanz gewonnen. Diese wurde der chromatographischen Analyse mit Aluminiumoxyd unterworfen; ihre alkoholische Lösung wurde durch eine Säule von Aluminiumoxyd

unter schwacher Absaugung einlaufen gelassen. Die Säule bestand aus einem 15 cm langen, mit Aluminiumoxyd gefüllten Glasrohr von 1.5 cm Durchmesser.

Aus den oberen zwei Dritteln wurde eine ungesättigte, gegen aktiven Wasserstoff beständige Säure als farbloses Öl erhalten. Es addiert Brom, entfärbt Kaliumpermanganatlösung und ist nicht katalytisch hydrierbar, was alles zeigt, daß die Doppelbindung in der Stellung C₇-C₈ der 12-Keto-7-cholensäure durch Ultraviolettstrahlen in die Stellung C₈-C₉ oder C₈-C₁₄ verschoben worden sein muß. Ausbeute 0.3 g. Das untere Drittel wurde in Ammoniak gelöst und mit verdünnter Salzsäure gefällt. Von dieser Fällung wurde ein Teil bromiert, aber kein krystallinisches Derivat erhalten und ein anderer Teil katalytisch mit Wasserstoff reduziert. Dabei wurden Nadelkristalle vom Schmelzpunkt 186-187° erhalten. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner 12-Ketocholansäure.

Literatur.

- ¹ Ohta, K., Z. physiol. Chem. 259, 53, 1939. — ² Makino, H., Ebenda 220, 49, 1933. — ³ Hammarsten, O., Ebenda 24, 322, 1898. — ⁴ Shimizu, T. u. Oda, T., Ebenda 227, 74, 1934; Shimizu, T. u. Kazuno, T., Ebenda 239, 67 u. 74, 1936; 244, 167, 1936; Jl. of Bioch. 25, 245, 1937. — ⁵ Kazuno, T., Z. physiol. Chem. 265, 1940 in Druck. — ⁶ Sihn, T. S., Ebenda 257, 232, 1939. — ⁷ Sihn, T. S., Ebenda 261, 93, 1939. — ⁸ Wieland, H. u. Dane, E., Z. physiol. Chem. 210, 281, 1932. — ⁹ Wieland, H. u. Wiedersheim, V., Ebenda 186, 239, 1930. — ¹⁰ Wieland, H. u. Boersch, E., Z. physiol. Chem. 106, 198, 1919; Wieland, H. u. Kapitel, W., Ebenda 212, 276, 1932. — ¹¹ Kaziro, K. u. Tsuji, K., Jl. of Bioch. 11, 333, 1930. — ¹² Kanitz, A., Z. physiol. Chem. 46, 484, 1905.