

417. Adolf Butenandt und Josef Schmidt: Über die polymorphen Modifikationen des Corpus-luteum-Hormons.

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Techn. Hochschule Danzig-Langfuhr.]

(Eingegangen am 20. November 1934.)

Aus Gelbkörper-Extrakten lassen sich zwei physiologisch aktive Hormon-Krystallisate isolieren¹⁾: eines schmilzt bei 128,5°, das andere bei 121–122°. Beide Stoffe lassen sich wechselseitig ineinander überführen²⁾.

Wir haben es auf Grund der Eigenschaften beider Substanzen von vornherein für sehr wahrscheinlich gehalten, daß es sich hier um polymorphe Krystall-Modifikationen ein und desselben chemischen Individuums handelt³⁾; die gleiche Vermutung ist von Allen und Wintersteiner⁴⁾ ausgesprochen worden, jedoch erlaubten die in beiden Arbeitskreisen bisher vorhandenen Stoffmengen keine eindeutige Sicherung dieser Anschauung. Die experimentelle Prüfung der Frage ist durch die Überführung des Pregnandiol⁵⁾ und des Stigmasterins⁶⁾ in Corpus-luteum-Hormon wesentlich erleichtert worden; das künstlich gewonnene Hormon zeigt alle Eigenschaften des natürlichen und ist ebenfalls in den beiden Formen vom Schmp. 128,5° und 121–122° gewonnen worden. Die nähere Beschreibung der vergleichenden — vorwiegend physiologischen — Untersuchung beider Krystallisate muß einer ausführlichen Veröffentlichung vorbehalten bleiben; es erscheint uns aber wünschenswert, das Ergebnis in der vorliegenden Mitteilung bekannt zu geben, um die herrschende Unsicherheit in der Frage nach der Zahl der Corpus-luteum-Hormone baldmöglichst zu beseitigen.

K. H. Slotta und Mitarbeiter haben in 6 Veröffentlichungen⁷⁾ mit großer Entschiedenheit die Ansicht vertreten, daß die beiden leicht ineinander zu verwandelnden Hormon-Krystallisate verschiedene chemische Individuen mit unterschiedlicher physiologischer Wirkung darstellen. Das bei 128° schmelzende Krystallisat („Luteosteron C“) soll im Corner-Test am kastrierten, erwachsenen Kaninchen „in Dosen bis zu 1 mg keinerlei Umwandlung (der Uterus-Schleimhaut) im Sinne einer Schein-Schwangerschaft, jedoch ein brunst-ähnliches Bild mit starker Gefäß-Erweiterung, ähnlich wie es nach Überdosierung von Follikel-Hormon auftritt“, hervorrufen. Das bei 120–121° schmelzende Krystallisat („Luteosteron D“) soll im Corner-Test mit 1,2 mg eine Umwandlung der Schleimhaut zum Bilde der Schein-Schwangerschaft bewirken, während eine hyperämisierende Wirkung am Uterus nur schwach angedeutet ist. 60–70 % Luteosteron C mit 40–30 % Luteosteron D sollen, zusammen verabreicht, schon in Dosen von 0,5 mg den positiven Corner-Test geben, „wobei sowohl die Hyperämie, wie die Schleimhaut-Umwandlung zu finden ist.“ „Das“ Schwangerschafts-Hormon

¹⁾ Butenandt, Westphal u. Hohlweg, Ztschr. physiol. Chem. **227**, 84 [1934]; B. **67**, 1440 [1934]; K. H. Slotta, H. Ruschig, E. Fels, B. **67**, 1270, 1624 [1934]; M. Hartmann u. A. Wettstein, Helv. chim. Acta **17**, 1370 [1934]; W. M. Allen u. O. Wintersteiner, Science **80**, 190 [1934]; Journ. biol. Chem. **107**, 321 [1934].

²⁾ E. Fels, K. H. Slotta, H. Ruschig, Klin. Wchschr. **13**, 1207 [1934]; B. **67**, 1624, 1949 [1934]; A. Butenandt u. J. Schmidt, B. **67**, 1901 [1934].

³⁾ B. **67**, 1612, 1902 [1934].

⁴⁾ Science **80**, 190 [1934]; Journ. biol. Chem. **107**, 321 [1934].

⁵⁾ B. **67**, 1901 [1934].

⁶⁾ B. **67**, 1611, 1903, 2085 [1934].

⁷⁾ B. **67**, 1270, 1624, 1947 [1934]; Klin. Wchschr. **13**, 1207 [1934]; Helv. chim. Acta **17**, 1363 [1934]; Ztschr. physiol. Chem. **228**, 215 [1934].

besteht nach dieser Ansicht aus einer Mischung zweier Substanzen, und das „Zusammenwirken der Luteosterone C und D“ erscheint danach als „der interessanteste und biologisch wesentlichste Punkt auf dem gesamten Gebiete“⁸⁾.

Alle unsere bisherigen Erfahrungen stehen im Widerspruch zu dieser Auffassung; wir glauben jetzt mit Sicherheit sagen zu können, daß es sich bei den beiden Krystallisaten um polymorphe Modifikationen ein und desselben Stoffes handelt. Diese Ansicht wird durch die folgenden Feststellungen belegt:

1) Umwandlung der beiden Formen ineinander durch Krystallisation: Die von K. H. Slotta und Mitarbeitern²⁾ zuerst beschriebene wechselseitige Umwandlung der beiden Krystallisate ineinander läßt sich nach unserer Erfahrung äußerst leicht durchführen, wenn man folgende Beobachtungen berücksichtigt: Die hochschmelzende Form (Prismen) bildet sich bevorzugt, wenn man eine heiße alkohol. Lösung des Hormons mit heißem Wasser bis zur eben beginnenden Trübung versetzt und ganz langsam erkalten läßt; die niedrig schmelzende Form (Nadeln) erhält man, wenn man eine kalte alkohol. Lösung des Hormons vorsichtig mit kaltem Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt und stehen läßt, oder wenn man das Hormon aus reinem wasser-freien Petroläther (Sdp. 70–80°) umkrystallisiert. Impft man jeweils mit der zu erwartenden Krystallform, so gelingt die wechselseitige Umwandlung beider Modifikationen mit absoluter Sicherheit und quantitativ; ohne Animpfen haben wir zumeist einen gleichartigen Erfolg gehabt, jedoch in einigen Fällen auch die Ausbildung beider Formen nebeneinander beobachtet. Die leichte wechselseitige Umwandelbarkeit der Hormon-Krystallisate ineinander spricht überzeugend für Krystall-Polymorphie.

2) Zusammensetzung der beiden Modifikationen: Die beiden Krystall-Formen haben mit Sicherheit die gleiche analytische Zusammensetzung $C_{21}H_{30}O_2$. In dieser Frage herrschte bis vor kurzem eine gewisse Unsicherheit, weil die wenigen vorliegenden Analysen des bei 121° schmelzenden Stoffes etwas zu geringe Kohlenstoff-Zahlen ergeben hatten⁹⁾. Wir fanden, daß dieses Verhalten besonders bei den Krystallisaten beobachtet wird, die aus wasser-haltigem Lösungsmittel dargestellt werden; möglicherweise halten sie eine geringe Spur Feuchtigkeit besonders fest zurück. Die analytische Schwierigkeit verschwindet, wenn man das Hormon aus wasser-freiem Petroläther krystallisiert:

4.690 mg Sbst. (3-mal aus reinem Petroläther vom Sdp. 70–80° umkrystallisiert, bei 80° im Vak. über P_2O_5 getrocknet, Schmp. 122°): 13.760 mg CO_2 , 3.950 mg H_2O .

$C_{21}H_{30}O_2$. Ber. C 80.20, H 9.62. Gef. C 80.02, H 9.43.

Dieses Analysen-Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den letzten Befunden von Slotta¹⁰⁾.

A. Neuhaus¹¹⁾ hatte aus Molekularrefraktions-Messungen an den krystallisierten Stoffen den Schluß gezogen, daß „Polymorphie beider Substanzen wohl völlig ausschließen“, daß „aber auch einfache Isomerie.... kaum noch denkbar“ sei; es wurde von ihm die Möglichkeit diskutiert, daß das niedrig schmelzende Krystallisat ein Mole-

⁸⁾ B. 67, 1626 [1934].

⁹⁾ Allen u. Wintersteiner, Science 80, 190 [1934]; A. Butenandt u. J. Schmidt, B. 67, 1904 [1934].

¹⁰⁾ B. 67, 1951 [1934].

¹¹⁾ B. 67, 1627 [1934].

kül Wasser mehr enthält. Wir haben aus diesem Grunde der Frage nach dem Wassergehalt des bei 121° schmelzenden Stoffes besondere Aufmerksamkeit geschenkt: Schon durch die Analyse und durch die Beobachtung, daß das vermeintliche „Hydrat“ gerade aus wasser-freien Lösungsmitteln besonders gut krystallisiert, wird die von Neuhaus diskutierte Möglichkeit widerlegt; wir haben überdies in einer Vakuum-Trockenpistole in Gegenwart von P_2O_5 die Umwandlung der aus verd. Alkohol gewonnenen und bei 78° getrockneten Nadeln vom Schmp. 121° in die Prismen vom Schmp. 128° durch 5-tägiges Erwärmen auf 117° durchgeführt und während des Versuchs die Wasser-Abgabe der Substanz geprüft; es trat ein Gewichtsverlust von insgesamt 1.22 % ein, während für 1 Mol Wasser 5.4 % zu erwarten wären. Inzwischen ist von Neuhaus¹²⁾ mitgeteilt worden, daß die Werte für die Brechungsexponenten des Hormon-Krystallisates vom Schmp. 121° zu berichtigen sind; die Neubestimmung der Brechungsexponenten ist noch nicht beendet, aber nach den bisherigen Ergebnissen läßt sich die Differenz der Molrefraktionen von beiden Stoffen bereits auf „die Größenordnung isomerer Substanzen herabdrücken“, so daß der Nachweis von der Gleichheit der Zusammensetzung beider Stoffe keinen Widerspruch mehr zu den refraktometrischen Ergebnissen darstellt.

3) Licht-Absorptionsvermögen und optische Drehung: Polymorphe Krystall-Modifikationen müssen in Lösung gleiche Eigenschaften besitzen. Allen und Wintersteiner⁴⁾, sowohl wie Slotta und Mitarb.¹⁰⁾ haben bereits gezeigt, daß beide Modifikationen identische Absorptionsspektren im Ultraviolett zeigen; ihre Form ist für α,β -ungesättigte Ketone charakteristisch. Wir haben festgestellt, daß beide Krystall-Formen auch die gleiche optische Drehung $[\alpha]_D = +192^{\circ}$ zeigen:

a) Krystallisat 128.5° : 20.3 mg in 2 ccm Alkohol absol., $l = 1$ dcm, $\alpha_D = +1.944^{\circ}$ (dritte Stelle als Mittel aus 10 Ablesungen); $[\alpha]_D^{20} = +191.5^{\circ}$.

b) Krystallisat 121° : 9.1 mg in 2 ccm Alkohol absol., $l = 1$ dcm, $\alpha_D = +0.872^{\circ}$ (dritte Stelle als Mittel aus 15 Ablesungen); $[\alpha]_D^{20} = +191.6^{\circ}$.

4) Identische Derivate: Wir haben bereits mitgeteilt⁵⁾, daß die beiden Hormon-Modifikationen identische Derivate liefern; die aus den beiden Stoffen vom Schmp. 121° und 128.5° dargestellten Dioxime vom Schmp. 244° zeigten keinerlei unterschiedliche Merkmale.

5) Physiologische Prüfung: Hr. Dr. Hohlweg hat im Hauptlaboratorium der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin, die beiden Krystallisate vergleichend im Clauberg-Test¹³⁾ untersucht. Es hat sich ergeben, daß beide Modifikationen qualitativ und quantitativ praktisch dieselbe physiologische Wirksamkeit zeigen, auch war kein Unterschied in der Wirkung der natürlichen und der synthetisch gewonnenen Präparate feststellbar: 0.5–0.75 mg bewirken eine eindeutige Umwandlung der proliferierten Gebärmutter-Schleimhaut in die prägravid Form. Es wurde auch kein Unterschied in der Erzeugung der Hyperämie beobachtet, bei beiden Präparaten war die hervorgebrachte Hyperämie sehr schwach.

Um die von Slotta und Mitarb.⁷⁾ betonte sechsfach potenzierte Wirkung eines Gemisches beider Stoffe nachzuprüfen, wurden 3 Tle. der einen Modifikation (Schmp. 121°) und 7 Tle. der anderen (Schmp. 128.5°) gemeinsam verabreicht. Eine Änderung der Wirksamkeit war nicht feststellbar, die physiologische Einheit lag wieder bei 0.5–0.75 mg. Die Verabreichung von 0.2 mg dieses Gemisches war bereits ohne jede erkennbare

¹²⁾ B. 67, 1948 [1934].

¹³⁾ vergl. Ztschr. physiol. Chem. 227, 84 [1934].

Wirkung. Durch dieses Ergebnis werden früher von uns gemachte Beobachtungen bestätigt: während der Aufbereitung von Gelbkörper-Extrakten haben wir wiederholt Gemische beider Krystall-Formen ausgewertet, sie haben stets die gleiche Wirksamkeit gezeigt, wie die seinerzeit von uns zunächst in reiner Form gefaßte hochschmelzende Modifikation.

Unsere Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Angaben von Allen und Wintersteiner¹⁴⁾, die — genau wie der Slottasche Arbeitskreis — den Allen-Corner-Test am erwachsenen Kaninchen bevorzugen. Sie geben an, daß beide Stoffe innerhalb der Fehlergrenzen des Testes dieselbe physiologische Aktivität besitzen und mit 0.6—1.0 mg die Umwandlung der Uterus-Schleimhaut bewirken. Aus diesen Daten geht zugleich hervor, daß die Unterschiede in den „Einheiten“ bei beiden Variationen des Testes nicht sehr erheblich sind. Wir sind damit beschäftigt, unsere Hormon-Zubereitungen auch im Allen-Corner-Test zu prüfen, um nach jeder Richtung gesicherte Vergleichs-Möglichkeiten in der Hand zu haben.

Die Ergebnisse der physiologischen Prüfung entsprechen völlig unseren Erwartungen. Da das reine Corpus-luteum-Hormon keine Hyperämie erzeugt, gewinnt die Ansicht an Wahrscheinlichkeit, daß die hyperämisierende Wirkung von Roh-zubereitungen des Corpus-luteum-Hormons auf Spuren von Follikel-Hormon zurückzuführen ist, von dem das Gelbkörper-Hormon stets begleitet wird. Wieweit eine — auch von Slotta und Mitarb.¹⁴⁾ diskutierte — „Aktivierung“ des reinen Corpus-luteum-Hormons durch Follikel-Hormon stattfindet, bedarf eingehender Prüfung.

Die vorstehenden Befunde lassen keinen Zweifel daran, daß es nach unseren gegenwärtigen Kenntnissen nur ein Corpus-luteum-Hormon gibt, das in reiner Form als ungesättigtes Diketon $C_{21}H_{30}O_2$ darzustellen ist und — genau wie das Follikel-Hormon¹⁵⁾ — in mehreren polymorphen Modifikationen krystallisiert. Es ist eine Frage des Zufalls, ob man bei der Darstellung des Hormons aus der Drüse, aus Stigmasterin oder Pregnandiol zunächst die Form vom Schmp. 121° oder die vom Schmp. 128.5°, bzw. ein Gemisch beider, erhält; aus diesem Grunde verlieren alle Erörterungen¹⁶⁾ darüber, welche Form primär in der Drüse gebildet wird, oder in welchem Verhältnis beide Formen im Extrakt vorhanden sind, ihren Sinn.

Wir danken Hrn. Dr. Hohlweg für die umfangreichen physiologischen Auswertungen, der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, der Rockefeller Foundation und der Schering-Kahlbaum A.-G., Berlin, für ihre Unterstützung.

¹⁴⁾ B. **67**, 1947 [1934].

¹⁵⁾ Kofler u. Hauschildt, Ztschr. physiol. Chem. **224**, 150 [1934].

¹⁶⁾ Slotta, Ruschig u. Blanke, B. **67**, 1947 [1934].