

## Aislamiento de $\alpha$ -Foliculina cristalizada de orina de caballo

Por VENANCIO DEULOFEU y JOSE FERRARI

A comienzos de este año, ZONDEK <sup>(1)</sup> anunció que la orina de caballos poseía alto poder estrógeno. Por las propiedades fisiológicas de los extractos obtenidos suponía que se trataba de la misma hormona estrógena que se encuentra presente en la orina de mujeres embarazadas.

La aplicación del método de preparación de foliculina que se utiliza en este Instituto a unos pocos litros de orina de caballo nos permitió aislar un producto cristalizado <sup>(2)</sup>, que tenía un punto de fusión 254-255° (corr.), que no daba depresión cuando se mezclaba con  $\alpha$ -foliculina pura, por lo que admitíamos se trataba de las mismas sustancias.

La pequeña cantidad de que disponíamos, obtenida en un primer ensayo, no nos permitió la identificación con absoluta seguridad, pero al poder obtener una mayor, lo hemos podido hacer, encontrando que sus propiedades físicas y químicas, salvo ligeras diferencias que no son de mayor importancia, concuerdan con la  $\alpha$ -foliculina de BUTENANDT y STÖRMER <sup>(3)</sup>.

Estos autores dan un punto de fusión de 255°, uno de 217-217,5° para el benzoato y un poder rotatorio de +156-158°. Nuestros cristales funden a 256° y tienen  $(\alpha)_D = +164^\circ$ . El benzoato funde a 217,5°, y el producto nuevamente solidificado funde a 205°.

A la variación en el poder rotatorio se puede atribuir poco valor, pues los datos de la literatura son variables. BUTENANDT y JACOBI <sup>(4)</sup>, encontraron en la foliculina aislada de las plantas valores entre +159-170°. Más importante

---

<sup>(1)</sup> *Nature*, 133, 209, 494 (1924). *Ark. Kem. Min. Geo.* 11 B, n° 24 (1934).

<sup>(2)</sup> DEULOFEU y FERRARI. *Nature*, 133, 835 (1934).

<sup>(3)</sup> *Zeit. physiol. Chem.* 208, 129 (1932).

<sup>(4)</sup> *Zeit. physiol. Chem.*, 218, 104 (1933).

es el caso del benzoato, cuyo doble punto de fusión es una propiedad que según BUTENANDT y STÖRMER es característica para el de la  $\beta$ -foliculina. Fué sin embargo imposible, a pesar de varias recristalizaciones, llegar al punto de fusión de  $220^\circ$  que esos autores dan para el benzoato de  $\beta$ -foliculina.

El alto valor estrógeno de nuestros cristales, que coincide con el del standard internacional de foliculina del Medical Research Council de Londres, indican sin embargo que se trata de  $\alpha$ -foliculina, pues el poder de la  $\beta$  es mucho menor.

Por lo tanto la substancia estrógena aislada de la orina de caballo, es idéntica con la  $\alpha$ -foliculina encontrada en la orina de mujeres embarazadas y en orinas de yeguas preñadas, y también con la única tokokinina de las plantas que se conoce en estado cristalino.

El aislamiento y la caracterización de esta hormona estrógena, no excluye la posibilidad que en la orina de caballos se encuentren otras substancias de este tipo.

Simultáneamente con nosotros, HÄUSSLER, del laboratorio de HOFFMANN-LA ROCHE, ha estudiado la substancia estrógena de la orina de caballo, habiendo llegado a las mismas conclusiones, es decir que es  $\alpha$ -foliculina (1).

#### PARTE EXPERIMENTAL

De los extractos brutos de 50 litros de orina de caballo, se obtuvo por adición de una solución alcohólica de semicarbazida la separación de una parte de la hormona. Se obtuvieron cristales de semicarbazona, bajo forma de finas agujas que se unen a rosetas. Se filtran y se lavan bien con alcohol al 80 % hasta quedar blanco. La semicarbazona impura funde a  $235^\circ$  pero no necesita purificarse para el trabajo ulterior.

Se la hidrolizó por ebullición con alcohol conteniendo 10 % de ácido clorhídrico. La solución resultante se diluyó con agua y el alcohol se destiló a vacío. La solución acuosa turbia obtenida se extrae varias veces con éter, el éter se lava con solución de carbonato de sodio, luego con agua y finalmente se evapora.

El residuo cristalino que así se obtiene, algo coloreado, se sublima al vacío a  $230-250^\circ$ , obteniéndose 75 mg de cristales que se lavan con muy poco éter helado, y tienen un punto de fusión de  $254^\circ$  (sin corr.). Estos cristales se recristalizaron varias veces de alcohol diluido, obteniéndose un punto de fusión constante de  $256^\circ$  (correg.:  $262^\circ$ ), placas rómbicas, incoloras. Mezclados con una foliculina de punto de fusión  $251-253^\circ$  (correg.:  $257-259^\circ$ ) dan una fusión a  $258-260^\circ$  (correg.). La fusión es ligeramente amarillenta y no roja como los cristales de orina de yegua que contienen equilenina.

13,6 mg en 2 cm<sup>3</sup> de cloroformo dan  $\alpha + 1,12^\circ$  ( $\alpha$ )<sub>D</sub> = + 164,7°:

*Benzoilación:* 5 mg de cristales se disuelven en hidrato de sodio al 4 % y se benzoilan en la forma corriente. El producto obtenido se recristaliza varias veces de alcohol, obteniéndose prismas largos, que funden a  $217,5^\circ$  (correg.:  $223^\circ$ ). El producto fundido una vez solidificado funde a  $205^\circ$  (correg.). Un punto de fusión mezclado con benzoato puro de  $\alpha$ -foliculina no da ninguna variación.

*Ensayo fisiológico:* Los cristales se titularon en ratas, que dan con una inyección de 0,3  $\gamma$  de la foliculina standard un alto porcentaje de estros totales.

Los cristales de orina de caballo, ensayados en una forma idéntica a la standard dieron:

Dosis 0,317 $\gamma$ ;	Animales 6;	Estro 5 (83 %)
Dosis 0,303 $\gamma$ ;	Animales 15;	Estro 9 (60 %)

(1) *Helv. chim. Acta* 17, 531 (1924).