

a number of mammalian species, we have observed that considerable quantities of metabolites were excreted in the urine. These were extractable into ethylenedichloride, absorbed light in the ultraviolet region (max. 251, 312 $m\mu$, min. 266 $m\mu$) and reacted with several phenolic reagents¹. There was a marked increase in the phenolic material when acidified urine was heated at 100°C for 1 h, indicating the presence of 'bound' phenolic products.

Phenolic material obtained from acid treated urine of guinea pigs that had received papaverine was extracted into ethylene dichloride at pH 7.0 and subjected to a 24 transfer countercurrent distribution with pH 3.9 citrate buffer and ethylene dichloride. The resulting distribution curve of the material absorbing at 251 $m\mu$ showed the presence of at least two compounds. The contents of plates 0–12, representing the major fraction of the total phenols, were pooled and again distributed in 24 plates with ethylene dichloride and pH 3.3 citrate buffer. Plates 10–16 showed the presence of a single phenolic product. These plates were pooled and the metabolite was extracted into ethylene dichloride at pH 7.0. After evaporation of the organic solvent the resulting compound was recrystallized twice from ethanol, yielding white crystals which melted at 162–164°C. An authentic sample of 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy benzyl) 6-7 dimethoxy isoquinoline, (4'-hydroxy papaverine) melted at 162–164°C and a mixed melting point of the two compounds showed no depression. The ultraviolet absorption and a fluorescent spectra of the metabolite and 4'-hydroxy papaverine were identical. Additional evidence for the identity of 4'-hydroxy papaverine was obtained from its behavior on paper chromatograms and its partition coefficients between various buffers and ethylene dichloride. From the countercurrent distribution it was calculated that about 40 to 50% of the administered papaverine was excreted as 4'-hydroxy papaverine in the guinea pig. Similar results were obtained in human subjects.

Incubating papaverine with microsomes from guinea pig or rabbit liver, reduced triphosphopyridine nucleotide, and oxygen² resulted in cleavage of papaverine to yield formaldehyde and 4'-hydroxy papaverine, as well as other phenolic products.

After the oral administration of papaverine to human subjects, about 99% of the phenolic transformation products was excreted in the urine in the 'bound' form. Incubating the urine with mammalian β -glucuronidase resulted in the liberation of about 80% of the phenols, suggesting that they are conjugated with glucuronic acid. Previous studies have shown that cell-free preparations can synthesize glucosiduronic acids in the presence of uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA) and phenolic acceptors³. When 4'-hydroxy papaverine was incubated with guinea pig microsomes and UDPGA almost all of the drug disappeared. Treating the incubation mixture with β -glucuronidase resulted in a quantitative recovery of the free phenol. These observations were taken as evidence that the microsomal pre-

paration can transfer glucuronic acid from UDPGA to 4'-hydroxy papaverine.

Acknowledgement.—Synthetic 1-(3'-methoxy-4'-hydroxy benzyl) 6-7 dimethoxy isoquinoline was kindly supplied by Dr. GERHARD BILLEK, Chemisches Laboratorium der Universität Wien.

J. AXELROD and J. K. INSCOE

National Institute of Mental Health, United States Public Health Service, Bethesda (Maryland), May 10, 1957.

Zusammenfassung

An Glukuronsäure gebundenes 1-(3'-Methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-6,7-dimethoxy-chinolin ist als Metabolit des Papaverins beim Menschen und bei Säugetieren erkannt und isoliert worden. Ein in den Lebermikrosomen enthaltenes Ferment, das sauerstoff- und TPNH-abhängig ist, bewirkt die Methoxylspaltung, und ein weiteres Ferment überträgt die Glukuronsäure aus ihrer Verbindung mit Uridinphosphat auf die entstandene phenolische Verbindung.

Zur Gewinnung von Induktionsstoffen aus Hühnerembryonen

Bei der chemischen Aufarbeitung 7–9 Tage alter Hühnerembryonen wurden nach verschiedenen Methoden Proteinfractionen voneinander getrennt, die nach der Implantation in Molchgastrulen in der präsumptiven Rumpfepidermis die Bildung von Vorderköpfen (*archencephale Induktion*¹) oder von Rumpfen mit Schwänzen (*spinokaudale Induktion*¹) hervorriefen². Bei der Fortführung dieser Versuche konnten zudem Stoffe isoliert werden, welche in 80–100% der Fälle grosse Hinterköpfe (*deuterencephal*¹) induzierten. Zum Teil liefen die Induktionen in einen Rumpf-Schwanz-Fortsatz aus. Zur Gewinnung dieser deuterencephal-spinokaudal wirkenden Fractionen wurden Hühnerembryonen homogenisiert und zentrifugiert. Der Rückstand wurde mehrmals mit 0,16 *m* NaCl-Lösung gewaschen, dann mit 0,05 *m* Pyrophosphatpuffer bei pH 9,5 bis 10,0 extrahiert und die wirksame Fraction aus dem zentrifugierten Extrakt bei pH 6,5 gefällt. In der Tabelle ist als Beispiel Fraction E 87 I + II aufgeführt. Diese Fraction wurde bei pH 7,4 mit Thioglykolsäure inkubiert. Nach der Behandlung mit Thioglykolsäure wurden keine spinokaudalen Induktionen mehr hervorgerufen, während die deuterencephale Induktionsfähigkeit nicht abgeschwächt war. Ausserdem induzierte die Fraction jetzt archencephale Organe, welche vorher nicht gebildet worden waren.

Nach Hydrolyse mit Trypsin (0,1–1,0 mg/cm^3 , 60 min, 25°) nahm die Zahl der spinokaudalen und deuterencephalen Induktionen ab. Bei diesen Versuchen wurde die Fermentwirkung durch Zugabe von Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor abgestoppt. Dadurch wurde verhindert, dass das Trypsin nach der Implantation in die Keime weiterwirkt. Ohne Abstoppen der Trypsinwirkung wurden die spinokaudale und die deuterencephale Wirksamkeit bei den gleichen Fermentkonzentrationen sowie bei einer noch geringeren Konzentration (0,012 mg/cm^3) vollständig aufgehoben.

¹ F. E. LEHMANN, *Einführung in die physiologische Embryologie* (Birkhäuser, Basel-Stuttgart 1945), S. 234.

² H. TIEDEMANN und H. TIEDEMANN, *Hoppe-Seylers Z.* 306, 7 (1956); 306, 132 (1956).

¹ O. FOLIN and V. CIOCALTEU, *J. biol. Chem.* 73, 627 (1927). – O. GERNGROSS, K. VOSS, and I. HERFELD, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 66, 435 (1933). – R. HOFMAN and N. PAPOVICI, *Pharm. Zentralh.* 76, 346 (1935).

² J. AXELROD, *J. biol. Chem.* 214, 753 (1955); *Biochem. J.* 63, 634 (1956).

³ G. J. DUTTON and I. D. E. STOREY, *Biochem. J.* 57, 275 (1954). – J. L. STROMINGER, K. M. KALCKAR, J. AXELROD, and E. S. MAXWELL, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 6411 (1954). – K. ISSELBACHER and J. AXELROD, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 1070 (1955).

Fraktion	Anzahl	positiv		Grösse der Induktion			Art der Induktion				
		Zahl	%	gross	mittel	klein	archen- cephal	deuteren- cephal	Rümpfe	Schwänze	unbestimmt
E 87 I – II . .	38	30	79	20	8	2	–	20	8	6	8
E 94 I	17	17	100	10	7	–	1	15	2	2	2
E 97 II	22	19	86	8	8	3	–	3	9	15	4

Der deuterencephale Induktionsstoff ist in NaCl- und KCl-Lösungen der Ionenstärke $\mu = 0,6\text{--}1,0$ löslich und fällt beim Verdünnen auf $\mu = 0,3$ zum Teil wieder aus. Die Tabelle enthält als Beispiel Fraktion E 94 I.

Wie die Abbauprobungen mit Trypsin zeigten, ist der Proteinanteil dieser Fraktion für die Induktionsfähigkeit sicher erforderlich. Dagegen ist noch nicht geklärt, ob auch die in der Fraktion enthaltene Desoxyribonukleinsäure hierfür notwendig ist.

Um zu prüfen, ob spinokaudale und deuterencephale Induktionsstoffe in der Zelle in verschiedenen Formbestandteilen enthalten sind, wurde nach dem Verfahren von DOUNCE³ eine Zellkernfraktion hergestellt. Sie induzierte vorwiegend deuterencephal. Dagegen induzierte die Fraktion, welche nach dem Abtrennen der Zellkerne hochtourig abzentrifugiert wurde, vor allem spinokaudal, daneben aber auch deuterencephal. Diese Faktoren konnten ebenfalls mit Pyrophosphatpuffer (s. oben) extrahiert werden (Tabelle E 97 II):

Aus dem Überstand des hochtourig zentrifugierten Embryonalextraktes (s. oben) konnte nach der Streptomycinsulfatmethode⁴ ein Ribonucleoprotein gewonnen werden, das ebenfalls deuterencephal induzierte. Die Wirksamkeit war jedoch schwächer als die von Fraktion E 94 I (Tabelle). Nach 3 min langem Erhitzen im siedenden Wasserbad induzierte das Ribonucleoprotein auch archencephal.

Die Untersuchungen werden fortgesetzt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

H. TIEDEMANN und
HILDEGARD TIEDEMANN

Heiligenberg-Institut, Heiligenberg (Bodensee), den
25. März 1957.

Summary

From chick embryos, fractions were prepared which, after implantation into new gastrulae, preponderantly give deuterencephalic or spinocaudal inductions. The behaviour of these fractions after incubation with thio glycolic acid or hydrolysis with trypsin is described.

³ A. L. DOUNCE in *The Nucleic Acids II* (Academic Press, New York 1900), p. 105.

⁴ S. S. COHEN, J. biol. Chem. 168, 511 (1947).

Demonstration of Ribonuclease Activity
in Sections from Carnoy Fixed Rat Pancreas

In an earlier communication¹, persisting ribonuclease (RNase) activity in sections from Carnoy-fixed rat

pancreas was considered to be an explanation for the complete removal of ribonucleic acid (RNA) through incubation in McIlvaine's buffer without addition of RNase. On the other hand, the only partial release of the RNA of formaldehyde-fixed tissue should be due to chemical degradation. The present communication demonstrates RNase activity in Carnoy-fixed material, and the inhibitory effect of the formaldehyde fixation procedure.

Experimental.—Small, fresh or frozen-dried² pieces of pancreas from decapitated rats were mechanically shaken in 100 ml of Carnoy's fluid (ethanol:chloroform:acetic acid = 6:3:1) for 1.5 h at room temperature, and then washed twice with absolute ethanol for 10 min. Other fresh pieces from the same glands were fixed in LILLIE's³ buffered formaldehyde solution (pH 7.0) for 24 h at room temperature, washed with running distilled water for 36 h, and dehydrated with alcohol (50% for 2 h, 96% for twice 2 h, absolute ethanol for three times 2 h). All dehydrated tissues were left in ether for three times 2 h, evacuated, weighed, and immersed in molten paraffin (m.p. 58°C) *in vacuo* at 59° ± 0.1°C for 30 min. Embedding followed at ice-water temperature. The paraffin blocks were sectioned at 7 μ setting of the microtome, and distributed equally between 50 ml centrifuge tubes². After deparaffination with petroleum ether and washing with ether, each tube contained about 50 mg of evacuated material. 5 ml of distilled water were added to the tubes, and their content homogenized with a Janke-Kunkel stainless-steel homogenizer. Further homogenizations with additional amounts of water were used for determination of the suitable tissue concentration in relation to substrate concentration, as demonstrated below. RNase activity was measured with the slightly modified ANFINSEN *et al.*⁴ method. 0.1 ml aliquots of the homogenates were added to McIlvaine's buffer, which contained yeast nucleic acid ('Hefenuklesäure', Merck, Germany, purified according to VISCHER and CHARGAFF⁵), at room temperature, and mechanically shaken in glass-stoppered centrifuge tubes at 37° ± 0.01°C for 60 min. Total volume: 4 ml. The reaction was stopped through addition of 4 ml of ice-cold 10% perchloric acid containing 0.25% uranyl acetate, and the samples left at + 2°C for approximately 60 min. After the first 20 min, no more acid-soluble material was released within the experimental period. Following centrifugation, the absorption of the supernatants was measured at 260 $m\mu$ in a Beckman Model DU quartz spectrophotometer with photomultiplier, using 10 mm cells. The readings were used in calculating the amounts of acid-soluble material released from RNA due to RNase action, with correction for substrate and tissue blanks. Thus, the activity is given in optical units at 260 $m\mu$. All deter-

² S. LAGERSTEDT, Z. Zellforsch. 45, 472 (1957).

³ R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic* (Blakiston, Philadelphia 1948).

⁴ C. B. ANFINSEN, R. R. REDFIELD, W. L. CHOATE, J. PAGE, and W. R. CARROL, J. biol. Chem. 207, 201 (1954).

⁵ E. VISCHER and E. CHARGAFF, J. biol. Chem. 176, 715 (1948).

¹ S. LAGERSTEDT, Exper. 12, 425 (1956).