

with II but not with I. Both I and II produced a slow contracture of the nictitating membrane in the cat, which response could be abolished by pretreatment with an α -blocking agent. The contracture of the nictitating membrane in response to electrical stimulation in the cat was not inhibited by I in contrast to the prompt inhibition observed with bretylium and guanethidine; II produced inhibition of the nictitating membrane response to electrical stimulation.

Catecholamine depletion of heart but not brain was observed with I in the rat. Pretreatment with bretylium inhibited depletion of heart catecholamines by I in the rat. No depletion of either brain or heart catecholamine levels was observed with II in the rat or the rabbit.

The antihypertensive activity of I appears to be due to catecholamine release and depletion without the bretylium component of action seen with guanethidine. Although the behavior of II in the anaesthetized normotensive animal suggests catecholamine release and α -blocking activity involving both pre- and post-synaptic sites of action at the sympathetic nerve terminal, these properties do not appear sufficient to account for the antihypertensive pattern of action of II in the hypertensive dog. Studies to define further the mode of action of these drugs are in progress.

7-Azaindole-3-acetamidoxime (I), m.p. 162–163.5°C, formed upon addition of hydroxylamine to 7-azaindole-3-acetonitrile;² calculated for $C_9H_{10}N_4O$: C, 56.83; H,

5.30; N, 29.46; found: C, 56.67; H, 5.34; N, 29.48. Sodioindole in dimethylformamide was treated with chloroacetonitrile and the resulting indole-1-acetonitrile converted directly to indole-1-acetamidoxime (II), m.p. 138.5–140°C; calculated for $C_{10}H_{11}N_3O$: C, 63.47; H, 5.86; N, 22.21; found: C, 63.54; H, 5.91; N, 22.18. The NMR-spectrum of II served to demonstrate that substitution had occurred at the 1-position of the indole nucleus.

Zusammenfassung. 7-Azaindol-3-acetamidoxim (I) und Indol-1-acetamidoxim (II) normalisieren hohen Blutdruck von Ratten und Hunden. Die blutdrucksenkende Wirkung von I scheint auf der Freisetzung von Brenzcatechinalaminen und der Erschöpfung ihrer Depots zu beruhen. Die Wirkung von II findet zur Zeit keine befriedigende Erklärung.

M. R. BELL, J. O. HOPPE, H. E. LAPE,
D. WOOD, A. ARNOLD and W. H. SELBERIS

*Sterling-Winthrop Research Institute, Rensselaer,
New York (N.Y. 12144, USA), 19th December 1966.*

² M. M. ROBISON and B. L. ROBISON, J. Am. chem. Soc. 78, 1247 (1956).

Die Isolierung von 17 β -Hydroxyandrost-4-en-3-on-17-sulfat (Testosteronsulfat) aus männlichem Urin¹

In einer früheren Arbeit² konnte gezeigt werden, dass nach Dioxan-Solvolyse von Urinextrakten normaler Männer geringe Mengen Testosteron freigesetzt wurden. HORTON et al.³ und CAMACHO und MIGEON⁴ fanden nach Injektion kleiner Dosen markierten Testosterons etwa 0,03 % der Aktivität in der solvolysierbaren Fraktion des Urins wieder. Während diese Arbeit fertiggestellt wurde, berichteten DESSYPRIS et al.⁵ über die Identifizierung von Testosteron, das nach Solvolyse im Urin von Männern nachweisbar wurde. Im folgenden soll die Isolierung von nichtgespaltenem Testosteronsulfat kurz dargestellt werden.

Methodik und Ergebnisse. Der 48-h-Urin eines endokrin gesunden Mannes (51 Jahre alt) wurde aufgearbeitet. Die nichtkonjugierten Steroide sowie deren Glucosiduronate wurden zunächst extrahiert, wie früher beschrieben⁶. Die nach Glucuronidase-Hydrolyse verbliebene wässrige Phase wurde kontinuierlich mit 2 Vol. Butanol:Äthylacetat (3:1 v/v) extrahiert und der Extrakt im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Der Extrakt wurde in 5 ml Aqua dest. aufgenommen und zur ersten präparativen Papierchromatographie im System S_I⁷ auf 20 Bögen Schleicher & Schüll 2043 b Mgl (42 · 19 cm) verteilt (Laufzeit 15 h bei 25°C). Authentisches Testosteronsulfat lief als Standard parallel (Lokalisation mittels UV-Kontaktphoto und Methylenblaureaktion⁸). Die korrespondierende Bande des Urinextraktes wurde mit 20%igem Methanol eluiert und eingeengt. Eine 2. Papierchromatographie im gleichen System wurde abgeschlossen. Danach war der Urinextrakt praktisch frei von

unspezifischem Material, so dass er für die dritte Papierchromatographie (ebenfalls System S_I) auf zwei Bögen verteilt werden konnte. Es liess sich eine scharfe Bande im UV-Photogramm und nach Methylenblaubehandlung nachweisen, die exakt dem Testosteronsulfat-Standard entsprach (Tabelle). Ein Teil dieser Bande wurde nach

	Rf-Werte im System S _I	UV- Kontakt- photo	Methylen- blau- reaktion	Absorption in konzentrierter H ₂ SO ₄ (Maximum in nm)
Testosteron- sulfat	0,41	+	+	300, 410, 470
Unbekannte Substanz	0,40	+	+	300, 405, 475

¹ Die in der Arbeit dargestellten Experimente wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt. Testosteronsulfat wurde dankenswerterweise durch die Merck A.G., Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

² K. D. VOIGT, U. VOLKWEIN und J. TAMM, Klin. Wschr. 42, 643 (1964).

³ R. HORTON, J. M. ROSNER und P. H. FORSHAM, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 114, 400 (1963).

⁴ A. M. CAMACHO und C. J. MIGEON, J. clin. Invest. 43, 1083 (1964).

⁵ A. DESSYPRIS, M. A. DROSDOWSKI, N. L. MCNIVEN und R. I. DOREMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 72, 1128 (1966).

⁶ J. TAMM, M. APOSTOLAKIS und K. D. VOIGT, Acta endocr. 53, 61 (1966).

⁷ J. TAMM, K. D. VOIGT und U. VOLKWEIN, Steroids 2, 271 (1963).

⁸ A. B. ROY, Biochem. J. 62, 41 (1956).

Elution mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt und das Absorptionsspektrum gemessen. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, stimmte es mit dem Spektrum des Standards völlig überein.

Auf Grund dieser Kriterien ist die Identität der aus dem Urinextrakt gewonnenen Substanz mit authentischem Testosteronsulfat gesichert. Ein weiterer Teil des Eluates des dritten Papierchromatogrammes wurde mit Dioxan⁹ solvolysiert und im System Propylenglykol/Hexan chromatographiert (Imprägnierung mit 20% Propylenglykol in Methanol, Laufzeit 24 h, Bezugssubstanz Corteson = 1, Lokalisation durch UV-Kontaktphoto). Als Standardsubstanzen liefen Testosteron und Epitestosteron parallel. Die aus dem Urinextrakt freigesetzte Substanz zeigte den gleichen R_S -Wert (0,59) wie Testosteron. Eine dem Epitestosteron entsprechende Zone liess sich nicht nachweisen (R_S -Wert für Epitestosteron = 0,96). Die den Standards korrespondierenden Urin-zonen wurden mit 80%igem Methanol eluiert und im Dünnschichtsystem Chloroform:Methanol (98:2, v/v) auf Silicagel G (Merck, Darmstadt) getrennt rechromatographiert (R_f -Wert für Testosteron und Epitestosteron 0,42 resp. 0,41). Nach Behandlung der Platten mit einem *p*-Toluolsulfonsäure-Spray zeigte sich unter der UV-Lampe nur die typische Grünfluoreszenz des Testosterons, während die charakteristische Rotfluoreszenz des Epitestosterons nicht nachweisbar war.

Diskussion. Während in den Mitteilungen anderer Autoren³⁻⁵ Testosteronsulfat im Urin «indirekt» nachgewiesen wurde, d.h. Testosteron erst nach einem Solvolysverfahren als freies Steroid identifiziert wurde, konnte in dieser Arbeit erstmalig das konjugierte Steroid als solches charakterisiert werden. Nach der solvolytischen Spaltung wurde nur Testosteron, nicht

dagegen Epitestosteron gefunden. Inzwischen wurde auch Epitestosteron-sulfat im menschlichen Urin identifiziert¹⁰. Die Quantitäten von Testosteron-sulfat im männlichen Urin sind relativ gering. DESSYPRIS et al.⁶ fanden 6–10 $\mu\text{g}/24\text{ h}$. Unsere eigenen Werte lagen mit 10–17 $\mu\text{g}/24\text{ h}$ geringgradig höher^{2,11}. Die im Vergleich zum Testosteron-glucosiduronat niedrige Ausscheidung von Testosteron-sulfat dürfte z.T. auf die sehr niedrige metabolische Clearance-Rate des Sulfatesters zurückzuführen sein¹².

Summary. Testosterone sulphate has been isolated from the urine of a normal male subject. The characterization of the substance was based upon the following criteria: Identical R_f values of authentic testosterone sulphate and of the unknown compound in the paperchromatographic system S_1 ; positive methylene blue-reaction and UV contact photogram; identical absorption spectra in concentrated sulphuric acid. Following dioxan solvolysis, only testosterone has been detected. Epitestosterone could not be found.

J. TAMM, U. VOLKWEIN und K. D. VOIGT

Hormonlabor, 2. Medizinische Universitätsklinik, Hamburg (Deutschland), 16. September 1966.

⁹ S. E. COHEN und J. B. ONESON, *J. biol. Chem.* 204, 245 (1953).

¹⁰ F. DRAY und M. J. LEDRU, *Excerpta Medica, Internat. Congr. Series No. 111* (Amsterdam, 1966) p. 281.

¹¹ J. TAMM, U. VOLKWEIN und Z. STARCEVIC, *Steroids* 8, 659 (1966).

¹² D. Y. WANG, *Androgens* (Ed. A. VERMEULEN); *Excerpta Medica, Internat. Congr. Series No. 101*, Amsterdam, 1966, p. 190.

Dose Response of Gastric Secretion, and Electrolyte Output in Pylorus-Ligated Rats to Insulin Hypoglycemia

It is well known that the s.c., i.m. and i.v. administration of insulin provokes gastric acid secretion in a variety of species^{1,2}. The exact mechanism(s) of this stimulatory effect is unknown; however, stimulation depends upon an adequate fall in blood sugar, and an intact vagal pathway¹. Insulin can, under certain circumstances, inhibit gastric secretion in man³ and dogs⁴, and moreover fails to stimulate gastric secretion by hypoglycemia in goats⁵. The close dependence of insulin-stimulated gastric secretion is well documented for dogs^{6,7}. However, little attention has been paid to the doses of insulin used in reported experiments with rats, a point which assumes importance, because differing patterns of gastric secretion have been reported following graded insulin dosage in dogs⁸. In the present study, using pylorus-ligated Shay rats⁹, attempts have been made to determine maximal gastric acid secretion, the pattern of gastric juice electrolytes, and the relationship between total acidity and the rate (volume) of gastric secretion, following graded doses of insulin.

The animals used were 60 male Sprague-Dawley rats from the Charles River Laboratories breeding shed I, weighing between 200 and 250 g. The rats were randomly divided into 6 groups of 10 rats per group, and, following

ligation under light ether anesthesia, were injected s.c. with 2, 4, 6, 8 and 10 U crystalline zinc insulin/100 g body weight. (All rats receiving 12 U insulin/100 g developed convulsions within 2 h.) Control rats received saline injections. 2 h later the rats were rapidly anesthetized with open ether and exsanguinated. (2 h collection periods have been recommended by BRODIE⁹ and by BAUME and LAW¹⁰ with pyloric ligation.) The gastric juice was drained into a centrifuge tube, and, following centrifugation, analyzed for gastric acidity and volume, and sodium,

¹ W. H. BACHRACH, *Physiol. Rev.* 33, 566 (1953).

² W. H. BACHRACH, *Gastroenterology* 44, 178 (1963).

³ W. H. OLSON and H. NECHELES, *Gastroenterology* 24, 362 (1953).

⁴ P. H. JORDAN JR. and R. QUINTANA, *Gastroenterology* 47, 617 (1964).

⁵ K. J. HILL, *Q. Jl exp. Physiol.* 37, 143 (1952).

⁶ B. I. HIRSCHOWITZ and D. K. O'LEARY, *Am. J. dig. Dis.* 9, 379 (1964).

⁷ M. M. EISENBERG, G. S. EMAS and M. I. GROSSMAN, *Surgery Gynec. Obstet.* 60, 111 (1966).

⁸ H. SHAY, D. C. H. SUN and M. GRUENSTEIN, *Gastroenterology* 26, 906 (1954).

⁹ D. A. BRODIE, *Am. J. dig. Dis.* 11, 231 (1966).

¹⁰ P. E. BAUME and D. H. LAW, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 119, 461 (1965).