

## БЫСТРОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ 4-ГИДРОКСИФЕНИЛЭТАНОЛА ИЗ МОЗГА БЫКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ WATERS SEP-PAK PLUS КАРТРИДЖЕЙ С ЛИПОФИЛЬНЫМ СОРБЕНТОМ (FLORISIL).

Н. Г. ПАНОВА, Н.В.ВЕСЕЛОВСКАЯ, А.Е.МЕДВЕДЕВ

НИИ биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул.10, Москва, 119832 Россия, факс: (095)-245-0857.

4-Гидроксифенилэтанол (компонент эндогенного ингибитора моноаминоксидаз трибулина) выделяли из мозга быка (2,5г) с использованием Waters Sep-Pak plus картриджей, содержащих сорбент Florisil. Выделенную фракцию трибулина мозга пропускали через картридж, который промывали этилацетатом. 4-гидроксифенилэтанол не сорбируется на данном типе картриджей. Использование Waters Sep-Pak картриджей, содержащих сорбент Florisil, существенно ускоряет приготовление препаратов 4-гидроксифенилэтанола из мозга для газо-хроматографического масс-спектрометрического анализа. В предварительных экспериментах показано, что картриджи, содержащие сорбент Florisil, могут быть использованы для быстрого выделения из мозга другого компонента трибулина — изатина.

Моноаминоксидаза (МАО) катализирует реакцию окисительного дезаминирования биогенных аминов, многие из которых выполняют нейромедиаторные функции в организме млекопитающих и человека. За последние годы заметно возрос интерес к эндогенной регуляции активности МАО. Трибулин - фракция эндогенных небелковых ингибиторов МАО и связывания бензодиазепиновых рецепторов, экстрагируемая в этилацетат, была обнаружена во многих тканях и биологических жидкостях млекопитающих и человека [1].

Химическую структуру этих соединений стали анализировать сравнительно недавно. Первым очищенным компонентом трибулина был 2,3-диоксииндол (изатин) [1,2], который избирательно тормозит активность МАО Б [2,3]. Затем из мозга и мочи были выделены и идентифицированы несколько МАО А ингибиторных компонентов трибулина [4,5]. 4-Гидроксифенилэтанол является компонентом трибулина мозга, избирательно ингибирующим МАО А [5]. Он обнаружен также и во фракции трибулина мочи человека и крысы (Medvedev, Halket, Glover, Sandler, готовится к публикации).

Процедура очистки 4-гидроксифенилэтанола из мозга включала несколько стадий колоночной хроматографии [5], использование которых малопригодно для изучения количественных характеристик обмена этого соединения *in vivo* в серийных образцах.

В последнее время все большее распространение получают методы хроматографии на картриджах Waters Sep-Pak (Millipore) с различными носителями. Они хорошо зарекомендовали себя при очистке большого числа соединений [6]. Для выделения компонентов трибулина этот подход ранее не применялся.

Целью настоящей работы была разработка методики ускоренного выделения гидроксифенилэтанола с использованием Waters Sep-Pak plus картриджей с липофильным сорбентом Florisil.

**Методика.** В работе использованы: хроматографические пластины с силикагелем 60 F<sub>254</sub> фирмы "Merk" (Германия); 4-гидроксифенилэтанол "Sigma" (США); изатин "Aldrich" (США), картриджи Waters Sep-Pak plus Florisil (Millipore, США). Остальные реактивы были производства "Реахим" (Россия).

2,5 г мозга быка гомогенизировали в 10 мм фосфатном буфере, pH 7,4. К полученному гомогенату добавляли равный объем (25 мл) 1N HCl и центрифугировали 30 мин при 10000 g. Прозрачную надосадочную жидкость экстрагировали двумя объемами этилового эфира уксусной кислоты. Органическую фазу промывали дистиллированной водой (2\*50 мл) до pH 7,0. Растворитель удаляли в вакууме (8-10 мм. рт. ст.) и затем сушили под струей азота. Полученные образцы трибулина мозга использовали в дальнейшей работе.

Для газо-хроматографического - масс-спектрометрического анализа сухой остаток растворяли в 300 мкл этанола. Аликвоты (200 мкл) упаривали досуха. К сухому остатку добавляли 25 мкл бис(триметилсилил)-трифторацетамида. Пробы дериватизировали 60 мин при 75°C и затем анализировали на масс-спектрометре Hewlett-Packard 5971 A (MSD), соединенным с газовым хроматографом Hewlett-Packard 5890 серии 11. Для идентификации 4-гидроксифенилэтанола определяли группу из четырех фрагмент-ионов, харак-

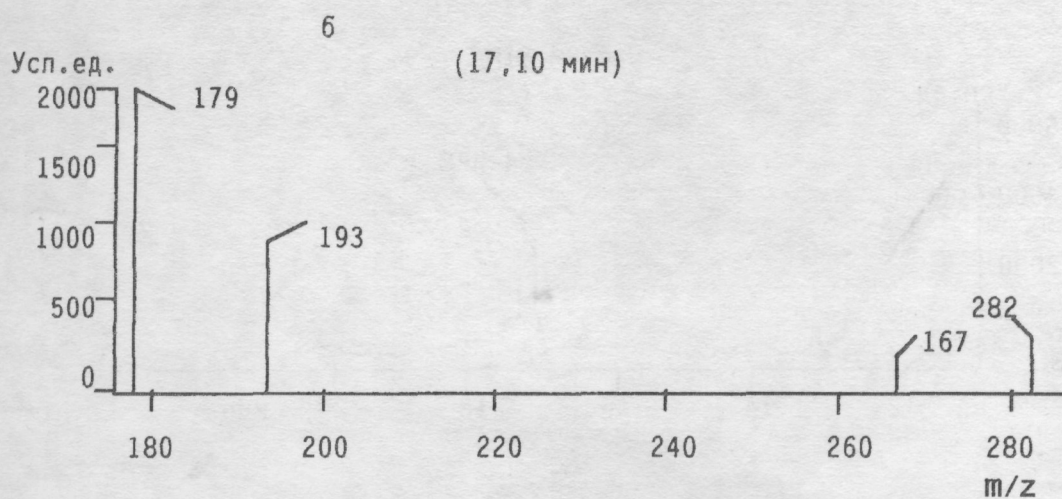
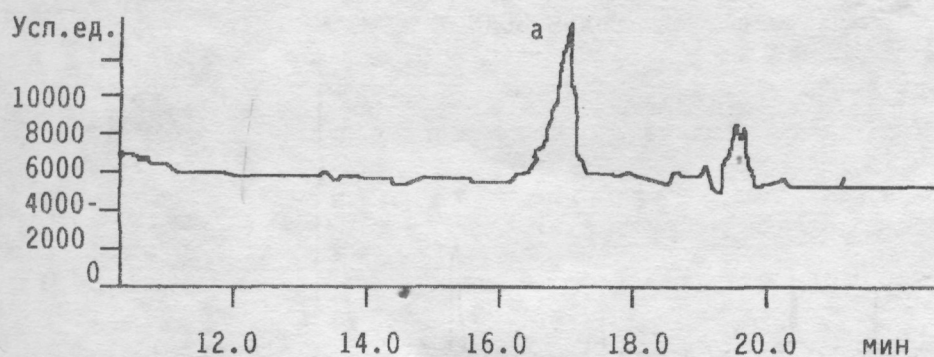


Рис. 1. Хроматограмма (а) и масс-спектр (б) стандартного раствора 4-гидроксифенилэтанола.

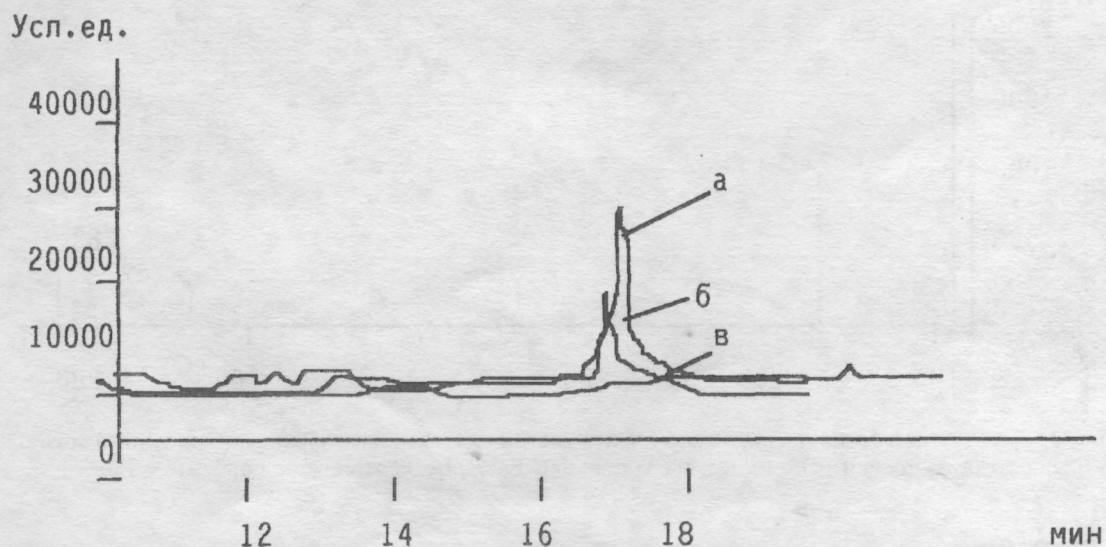


Рис. 2. Отсутствие сорбции 4-гидроксифенилэтанола на Waters Sep-Pack Florisil картридже. а — профиль элюции первой фракции; б — профиль элюции второй фракции (элюция этанолом).  
Остальные пояснения приведены в тексте.

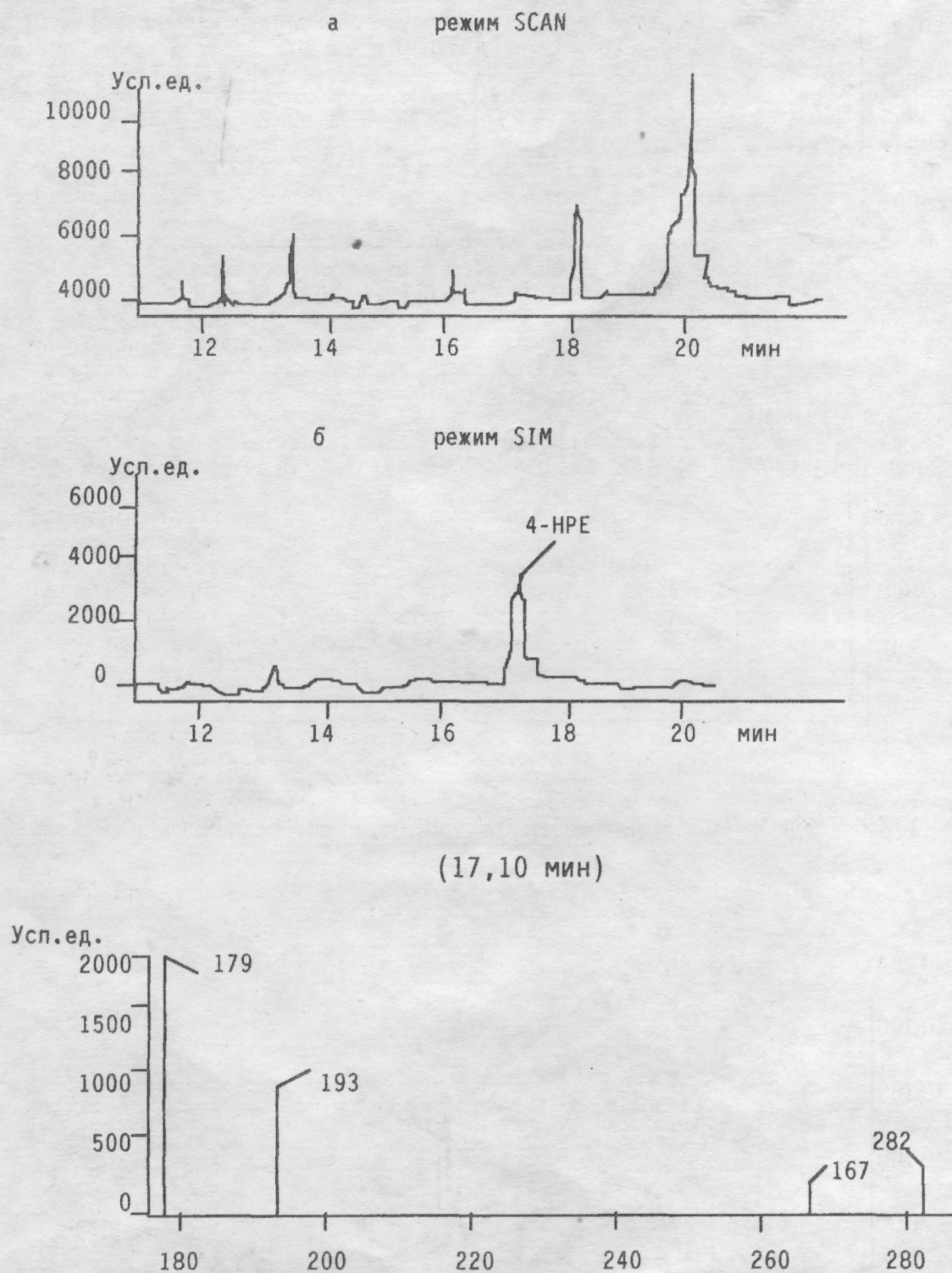


Рис. 3. Газо-хроматографический-масс-спектрометрический анализ фракции трибулина мозга быка до (а) и после (б) очистки на Waters Sep-Pack plus картридже с сорбентом Florisil

терных для бис(триметилсилил)- производного 4-гидроксифенилэтанола (Рис.1) [5].

**Результаты и их обсуждение.** Полученные биологические образцы (см. раздел Методика) растворяли в 3 мл этилового эфира уксусной кислоты и с целью удаления примес-



ных липидов наносили на Waters Sep-Pak plus картридж с липофильным сорбентом Florisil. После сбора первой фракции картридж промывали одним объемом этилацетата и таким же количеством этилового спирта. Предварительный анализ фракций методом тонкослойной хроматографии показал, что 4-гидроксифенилэтанол не сорбируется на картриджах с сорбентом Florisil. Эти данные были подтверждены более чувствительным методом газо-хроматографического-масс-спектрометрического анализа (Рис 2.).

В исходной фракции трибулина мозга было идентифицировать 4-гидроксифенилэтанол практически невозможно (Рис 3а). После очистки на картридже и последующего концентрирования образца пик этого соединения определяется достаточно четко (Рис 3б). При элюции нанесенной на картридж фракции трибулина этанолом 4-гидроксифенилэтанол не определялся (данные не приведены).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что 4-гидроксифенилэтанол как индивидуально, так и в смеси с другими соединениями, присутствующими во фракции трибулина мозга, не сорбируется на липофильном носителе типа Florisil. Это позволяет существенно ускорить процедуру количественного определения 4-гидроксифенилэтанола в препаратах мозга.

Таким образом, использование подобных картриджей представляется перспективным для выделения эндогенных низкомолекулярных соединений из биологических объектов, содержащих большое количество липидов.

В предварительных экспериментах обнаружено, что другой компонент трибулина изатин (2,3-диоксииндол), может быть выделен с применением данного типа картриджей. Изатин также не сорбируется на носителе Florisil. Последнее подтверждено методом тонкослойной хроматографии ( $R_f=81$ , система метанол-этилацетат, 1:1). Правда, для выхода изатина картридж необходимо промывать большим объемом этилацетата.

Работа поддержана Российским Фондом Фундаментальных Исследований (No 9404-11531).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Glover V., Sandler M., in: Monoamine Oxidase: Basic and Clinical Aspects, VSP, Utrecht, 1993, 61-71.
2. Glover V., Halket J., Watkins P., Clow A., Goodwin B., Sandler M., J. Neurochem., 1988, 51, 656-659.
3. Medvedev A.E., Goodwin B.L., Clow A., Halket J., Glover V., Sandler M., Biochem. Pharmacol. 1992, 44, 590-592.
4. Medvedev A.E., Halket J., Goodwin B.L., Sandler M., Glover V., J. Neural Transm., 1995, 9, 225-237.
5. Медведев А.Е., Камышанская Н.С., Халкет Д., Гловер В., Сандлер М., Биохимия, 1995, 60 (5), 659-667.
6. WATERS SEP-PAK CARTRIDGE (Care and Use Manual), Millipore corporation, 1993.

#### RAPID ISOLATION OF 4-HYDROXYPHENYLETHANOL FROM BOVINE BRAIN USING WATERS SEP-PAK PLUS FLORISIL CARTRIDGES (MILLIPORE)

N.G.PANOVA, N.V.VESELOVSKAYA, A.E.MEDVEDEV

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya ul. 10, Moscow, 119832, Russia; Fax: (095) 245-0857.

4-Hydroxyphenylethanol, MAO-A Inhibitory component of endogenous MAO Inhibitory activity, tribulin, was isolated from a small quantity of bovine brain using Waters Sep-Pak Florisil cartridges. Procedure included isolation of crude tribulin fraction, which was passed through the cartridge. Preliminary data revealed that this substance is not absorbed on Florisil.

The employment of this type of cartridges essentially accelerates isolation of 4-hydroxyphenylethanol from brain samples for quantitative determination.

Pilot experiments also revealed that Sep-Pak Florisil cartridges could be used for the rapid isolation of isatin, another endogenous MAO (B) inhibitor, from brain tissue.