IDENTIFICAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ADRENALINA E ARTERENOL NA ADRENAL DE OFÍDIOS (1).

CATHARINA M. W. BRANDI (2), E. CABIB (3) & J. L. PRADO

(Laboratórios de Farmacologia e Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil e Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina.)

A adrenalina e o arterenol já foram identificados em extratos de adrenal de várias espécies (cf. von Euler, 1950). Valle e Porto (1945) determinaram o conteúdo de aminas simpatomiméticas nas adrenais de *Bothrops jararaca,* mas como o método biológico empregado não permitia esclarecer a natureza das substâncias estudadas, pensamos em identificá-las por cromatografia.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos extratos. Cinco a dez serpentes adultas (*Philodryas* sp.) (4) foram anestesiadas com pentobarbital e suas adrenais (peso fresco médio, 27 mg) removidas, separadas da melhor maneira possível de tecidos aderentes e os extratos para cromatografia preparados segundo Cabib (1951).

Cromatografia. Utilizamos papel de filtro Whatman n.º 1, lavado segundo as recomendações de Hanes e Isherwood (1949). A câmara de cromatografia era idêntica à descrita por Block (1950), o solvente conforme Cabib (1951), e as manchas reveladas segundo James (1948). Nas cromatografias dos extratos empregavam-se simultaneamente, conforme as experiências, substâncias padrões mencionadas a seguir.

Colocando-se uma faixa do extrato sôbre o papel, na linha de origem, e fazendo-se a cromatografia com álcool etílico a 96%, conseguia-se uma purificação preliminar. A "revelação" de uma estreita fita lateral com o reagente

Recebido para publicação em 12.XII.53.

(1) Com auxílio parcial do Conselho Nacional de Pesquisas.

(2) "Bolsa Lederle de Farmacologia e Quimioterapia, 1953".

(3) Endereço permanente: Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Julian Alvares 1719, Buenos Aires.

(4) Nossos agradecimentos ao Prof. Dr. D. Fonseca Ribeiro, então Diretor do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos ofídios empregados.

de ferricianeto, permitia a localização do material cromatografado e, consequentemente, a sua eluição com água. O eluato, evaporado em vácuo, era então recromatografado com o solvente álcool/cloreto de amônio (Cabib, 1951) ou com fenol em atmosfera de ácido cloridrico.

Ensaio biológico. Ensaiámos a atividade vaso-constritora dos eluatos na preparação vascular de Läwen-Trendelenburg empregando o *Bufo ictericus,* Spix, como animal de experiência e a técnica recomendada por Rapela (1948).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia em papel dos extratos originais com etanol/cloreto de amônio revelou duas manchas com as mesmas côres da adrenalina e da nor-adrenalina respectivamente, mas com valores de Rf muito mais altos (Fig. 1). Quando a adrenalina e a nor-adrenalina eram misturadas ao extrato original sòmente apareciam aquelas duas manchas, talvez porque alguma impureza contida no extrato modificava os Rf das substâncias adicionadas. Por causa disto os extratos originais foram inicialmente purificados por cromatografia com etanol a 96%, e depois recromatografados com etanol/cloreto de amônio. Nessas condições apareceram duas manchas, que correspondiam à adrenalina e ao arterenol, e ainda uma terceira mancha, mais rápida, e que designamos mancha X (Fig. 2). Êste composto *X,* extraido do papel,, possuia propriedades vaso-constritoras quando ensaiado na preparação de Läwen-Trendelenburg. A mesma fig. 2 mostra que outras substâncias relacionadas tais como hidroxitiramina e epinina, que poderiam estar presentes nas adrenais, migram no papel com velocidade completamente diferente do composto X. Entretanto, quando uma amostra de epinina foi adicionada ao extrato antes da cromatografia, a mancha X foi reforçada (Fig. 2). Poder-se-ia pensar dai ser a substância responsável pela nova mancha a própria epinina mas a recromatografia com fenol da mancha X reforçada veio revelar duas manchas correspondentes, provavelmente, a duas substâncias diferentes. Preparando-se os extratos de adrenal com álcool /ácido clorídrico (Shepherd e West, 1952) em lugar de ácido tricloroacético, sòmente duas manchas, com os mesmos Rf da adrenalina e nor-adrenalina, apareceram no cromatograma.

Todos êstes resultados podem ser explicados se for feita a suposição de que a substância X corresponde a um composto da adrenalina com o ácido tricloroacético, do tipo descrito por Shepherd e West (1952). Na verdade, verificamos que adrenalina autêntica, misturada com um pouco de ácido tricloroacético antes da cromatografia, dá origem a duas manchas no cromatograma, uma com o Rf da adrenalina e outra, com um Rf bastante semelhante àquele da mancha X.

RESUMO

A adrenalina e o arterenol foram identificados, por cromatografia em papel, em extratos de adrenais de ofídios (*Philodryas* sp.).

Se os extratos são preparados com ácido tricloroacético, aparece nos cromatogramas uma terceira mancha, que possúi atividade vaso-constritora. Esta terceira substância corresponde provavelmente a um composto de adrenalina com ácido tricloroacético, do tipo descrito por Shepherd e West (1952).

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 2. *Diagrama de cromatograma de extrato adrenal purificado.*

A — mistura de adrenalina e nor-adrenalina sintéticas.

a) mancha da nor-adrenalina (azul); b) mancha da adrenalina (rosa).

B — Extrato original de adrenal.

C — Extrato original misturado com adrenalina e nor-adrenalina.

Fig 2. *Diagrama de cromatograma de extrato adrenal purificado.*

A — manchas de nor-adrenalina (a) e adrenalina (b).

B — Epinina

C — Extrato adrenal purificado; nor-adrenalina (a), adrenalina (b) e mancha X.

D — Extrato adrenal purificado misturado com epinina; nor-adrenalina (a), Adrenalina (b) e mancha X reforçada.

E — Hidroxitiramina.

CHROMATOGRAPHIC IDENTIFICATION OF ADRENALINE AND ARTERENOL IN SNAKE ADRENALS (1).

CATHARINA M. W. BRANDI (2), E. CABID (3) AND J. L. PRADO

(Laboratórios de Farmacologia e Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil and Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina).

Both adrenaline and arterenol have been reported to be present in extracts from the adrenal glands of several species (cf. von Euler, 1950). Valle & Porto (1945) determined the content of sympathomimetic substances in the adrenal glands of *Bothrops Jararaca.* As the biological assays then used do not give sufficient information about the nature of the compounds involved, it was decided to identify them by paper chromatography.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of the extracts. Five to ten adult snakes *(Philodryas)* (4) were anesthetized with pentobarbital. The adrenal glands (average wet weight 27 mg) were freed as much as possible from adherent tissues, and the extracts for chromatography prepared as described by Cabib (1951).

Chromatography. Washed (Hanes and Isherwood, 1949) Whatman n.º 1 paper was employed throughout. The chromatographic chamber was similar to that devised by Block (1950). The solvent was the same previously used (Cabib, 1951) and the spost were revealed according to James (1948). Standard substances were always run by side with the unknowns in the same chromatogram.

In several instances a preliminary purification was carried out as follows: a band of the extract was applied along the starting line and chromatographed

1) Partially aided by a grant from the "Conselho Nacional de Pesquisas".

2) With the fellowship "Bolsa Lederle de Farmacologia e Quimioterapia, 1953".

3) Permanent address: Instituto de Investigaciones Bioquímicas, Fundación Campomar, Julian Alvares 1719, Buenos Aires.

4) Thanks are due to Prof. D. Fonseca Ribeiro, then Director of Butantan Institute, who supplied the snakes employed.

with 96 per cent ethanol. After spraying a guide marginal strip with the ferricyanide reagent, the whole band containing the substances was cut off and eluted with water. The eluate was evaporated in vacuo rechromatographed with the alcohol-ammonium chloride solvent (Cabib, 1951) or with phenol in a hydrochloric acid atmosphere.

Biological assay. The vaso-constricting activity of the eluates was tested on the vascular Läwen-Trendelenburg (L. T.) preparation with *Bufo ictericus* Spix, following the directions given by Rapela (1948).

RESULTS AND DISCUSSION

By paper chromatography of the original extracts with ethanol/ammonium chloride two spots were obtained with the same colors as adrenaline and nor-adrenaline respectively, but with much higher Rf values, as shown in Fig. 1. When adrenaline and nor-adrenaline were mixed with the original extracts prior to chromatography the same spots appeared as with the extract alone, suggesting that some impurity present in the latter was modifying the Rf values of the substances. Therefore the original extracts were first submitted to chromatography with 96 per cent ethanol, the compounds eluted from the paper and chromatographed again with ethanol/ammonium chloride. Two spots, corresponding to adrenaline and arterenol were obtained; but a third, faster-moving one (spot X) was also visible (Fig. 2). Compound X was extracted from the paper and found to be a vaso-constricting substance on the L. T. preparation. Other related substances, which might be present in the adrenals, such as hydroxytyramine and epinine, move along the paper at a rate completely different from that of compound X (Fig. 2). When some epinine, however, was added to the extract before chromatography, spot X was reinforced, as shown in Fig. 2. By chromatography of the extract mixed with epinine, followed by extraction of spot X and new chromatography with phenol, two spots were obtained, showing that epinine and substance X are probably different compounds. When alcohol/hydrochloric acid (Shepherd and West, 1952) was used instead of trichloroacetic acid to extract the adrenal glands, only two spots appeared on chromatography, with the same Rf values as adrenaline and arterenol.

All these results may be accounted for if it is assumed that substance X is an adrenaline-trichloroacetic acid compound, of the type described by Shepherd and West (1952). Moreover, addition of some trichloroacetic acid to authentic adrenaline before chromatography, results in the appearance of two spots, one with the same Rf as adrenaline and the other with Rf rather similar to that of spot X.

SUMMARY

Adrenalin and arterenol were identified by paper chromatography in extracts from snake adrenals (*Philodryas* sp.).

When trichloroacetic acid extracts were chromatographed, a third spot, corresponding to a vaso-constricting substance, also appeared. This third substance was tentatively identified as an adrenaline-trichloroacetic acid compound, of the type described by Shepherd and West (1952).

REFERENCES

1. *Block, R. J.* — Analyt. Chem. **22**: 1327. 1950.
2. *Cabib, E.* — Rev. Soc. Argent. Biol. **27**: 19. 1951.
3. *Euler, U. S. v.* — Ergebn. d. Physiol. **46**: 261. 1950.
4. *Hanes, C. S.* and *F. A. Isherwood* — Nature **164**: 1107. 1949.
5. *James, W. O.* — Nature 161: 851. 1948.
6. *Rapela, C. E.* — Methods in Medical Research, The Year Book Publishers, Chicago, **1**: 129. 1948.
7. *Shepherd, D. M.* and *G. B. West* — Nature **169**: 797. 1952.
8. *Valle, J. R.* and *A. Porto* — Mem. Inst. Butantan **18**: 247. 1944-45.

LEGENDS TO THE FIGURES

Fig. 1. *Diagram of a chromatography of original adrenal extract.*
A — Mixture of synthetic adrenalin and arterenol; a) arterenol sport (blue); b) adrenalin spot (pink).
B — Original adrenal extract.
C — Original adrenal extract mixed with adrenalin and arterenol.

Fig. 2. *Diagram of a chromatography of purified adrenal extract.*
A — Arterenol (a) and adrenaline (b) spots.
B — Epinine.
C — Purified adrenal extract; arterenol (a), adrenalin (b) and spot X.
D — Purified adrenal extract mixed with epinine; arterenol (a), adrenalin (b) and reinforced spot X.
E — Hydroxy-tyramine.

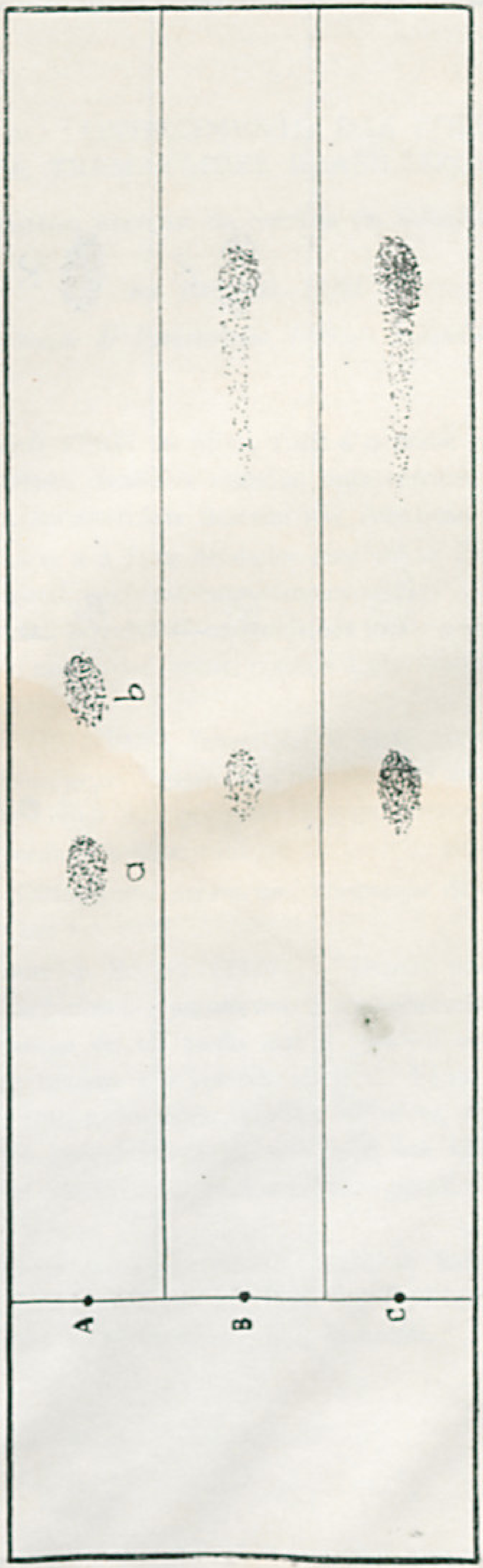

Fig. 1

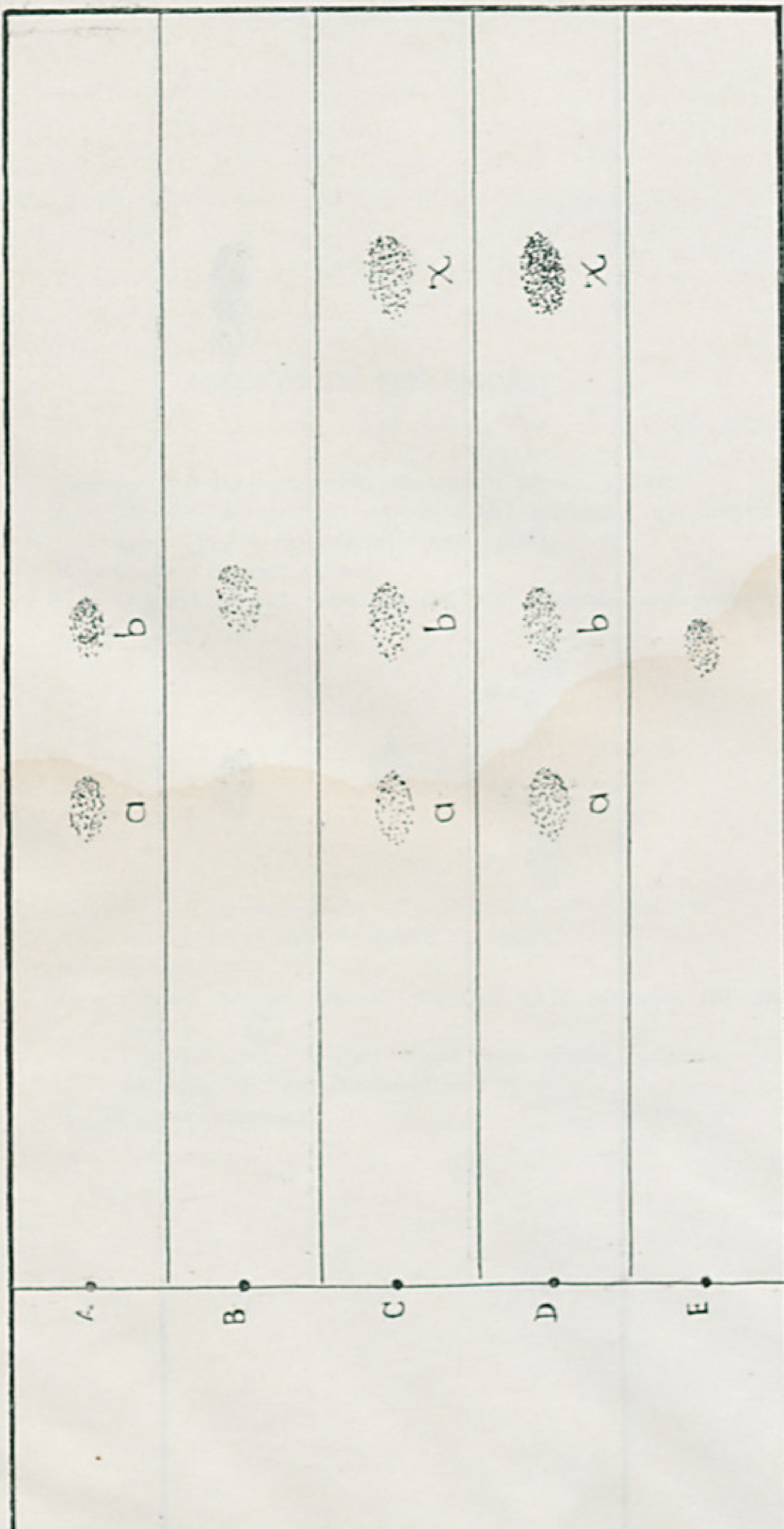

Fig. 2