

Chemická charakterizácia niektorých nízkomolekulových zložiek včelieho jedu

L. REXOVÁ, O. MARKOVIČ

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Ako sme uviedli v predchádzajúcej práci [1], možno po rozdelení zostupnou elektroforézou na papieri podľa O. Mikeša [2] dokázať v natívnom včelom jede okrem hlavných bielkovinových zložiek, ktorých chemické, farmakologické, resp. enzymatické vlastnosti sledovali W. Neumann [3], W. Neumann, E. Habermann [4—6], F. G. Fischer, H. Dörfel [7], F. G. Fischer, W. P. Neumann [8] a W. Grassmann, E. Hannig [9, 10], tiež prítomnosť niekoľkých nízkomolekulových frakcií, ktoré neboli dosiaľ bližšie charakterizované. Sledovali sme preto možnosť získať homogénne nízkomolekulové frakcie a v prípade zložiek peptidického charakteru sme sa pokúsili určiť obsah aminokyselín a bližšie charakterizovať Pauly-pozitívne frakcie označené P_0 , P_1 a P_2 , ktoré sme opísali v predchádzajúcom oznámení [1].

Experimentálna časť

Materiály a metódy

V pokusoch sme používali natívny včelí jed, získaný mechanicky metódou [11], ktorý sme po rozpustení vo vode a odstránení nerozpustných častíc (zvyšky žihadiel) zahustili mrazovou sublimáciou.

Preparatívne rozdelenie včelieho jedu v päťkomorovom elektroforetickom prístroji na frakcie kyslé, neutrálne a bázické sme uskutočnili v usporiadaní podľa J. Vaněčka a spolupracovníkov [12]. Jednotlivé komory sme plnili nasledujúcimi elektrolytmi (od anódy ku katóde):

1. 1,35 ml 85 % kyseliny mravčej doplnené do 250 ml H_2O ,
2. 1,25 ml kyseliny octovej ľadovej, doplnené do 250 ml H_2O ,
3. 1 g natívneho včelieho jedu v 250 ml H_2O ,
4. 0,17 ml 27 % NH_4OH doplnené do 250 ml H_2O ,
5. 0,34 ml 27 % NH_4OH doplnené do 250 ml H_2O .

Rozdeľovanie prebiehalo pri svorkovom napätí 500 V po dobu 6 hodín, pričom intenzita prúdu v prvých 30 minútach vystúpila z hodnoty 90 mA na 123 mA a potom postupne klesala až na hodnotu 12 mA. Po piatich hodinách sme rozdeľovanie prerušili a obsah komôr 1 a 5 sme vymenili za príslušný čerstvý elektrolyt. Priebeh rozdeľovania sme kontrolovali po 3 a 6 hodinách rozdelením 0,3 ml podielov z každej komory zostupnou elektroforézou na papieri v tlmivom roztoku pyridín—kyselina octová o pH 5,6 s gradientom 28 V/cm 60 minút. Po skončení rozdeľovania sme obsah jednotlivých komôr zahustili mrazovou sublimáciou.

Preparatívne rozdeľovanie elektroforézou na papieri

Keďže sa mrazové sublimáty z komôr 1 a 2 svojím obsahom podstatne nelíšili, spojili sme ich a ďalej rozdeľovali zostupnou elektroforézou na papieri [2]. Rovnako sme spracovali obsah komôr 4 a 5. Rozdeľovalo sa na chromatografickom papieri Whatman 3 MM s gradientom 28 V/cm po dobu 120 minút. Po rozdelení a elúcii jednotlivých zón sa do eluátu dostávali i niektoré aminokyseliny z papiera (najmä lyzín, serín a alanín), ktoré pri spojení eluátov z viacerých hárkov papiera mohli skresľovať výsledky. Vzorky sme nanášali len na polovicu hárka papiera, pričom druhá polovica slúžila ako slepý pokus. Pri vystrihovaní a elúcii jednotlivých zón sme paralelne spracovávali aj druhú polovicu papiera. Po detekcii okrajov nanášky 0,2 % roztokom ninhydrínu v acetóne sme jednotlivé zóny z ostávajúcej časti papiera vystrihli, eluovali vodou a odparili vo vákuovom exsikátore nad KOH. Pri elektroforetickom rozdeľovaní mrazových sublimátov z komôr 4 a 5 sme elektroforeogramy detegovali 0,2 % roztokom ninhydrínu, Paulyho činidlom a Hanes—Isherwoodovým činidlom modifikovaným podľa [13]. Sublimáty z komôr 1 a 2 sme nanášali do stredu papiera, zatiaľ čo rozdeľovanie látok z komôr 4 a 5 prebiehalo najlepšie, ak sme látku naniesli 20 cm od spodného okraja papiera.

Preparatívne rozdeľovanie chromatografiou na papieri

Odparky eluátov z elektroforézy na papieri sme preparatívne ďalej rozdeľovali na chromatografickom papieri Whatman 3 MM, pričom sme vedľa eluátov jednotlivých vzoriek naniesli zodpovedajúce slepé pokusy. Chromatogramy sme opakovane vyvíjali v systéme S₁. Okraje chromatogramov sme detegovali 0,5 % roztokom ninhydrínu a Reindlovým činidlom [14], v prípade báziických frakcií aj Paulyho, prípadne Sakaguchiho činidlom [15]. Jednotlivé zóny sme eluovali vodou, odparili vo vákuovom exsikátore a ich homogenitu sme sledovali chromatografiou jednej pätiny, prípadne jednej tretiny celkového množstva odparku v zmesiach S₂, S₃ a S₄ (tab. 1).

Tabuľka 1

	Chromatografické systémy
S ₁	<i>n</i> -butylalkohol—kyselina octová—voda 4 : 1 : 5
S ₂	<i>n</i> -butylalkohol—kyselina octová—pyridín—voda 15 3 : 10 : 12
S ₃	<i>n</i> -butylalkohol—pyridín—voda 5 : 5 : 2
S ₄	sek. butylalkohol—3 % amoniak 3 : 1
S ₅	fenol—voda (amoniak)

Úplná hydrolýza

Elektroforetický a chromatografický homogénne frakcie pozitívne s ninhydrínom a Reindlovým činidlom sme 48—72 hodín hydrolyzovali 6 N-HCl v zatavených rúrkach pri teplote 105 °C.

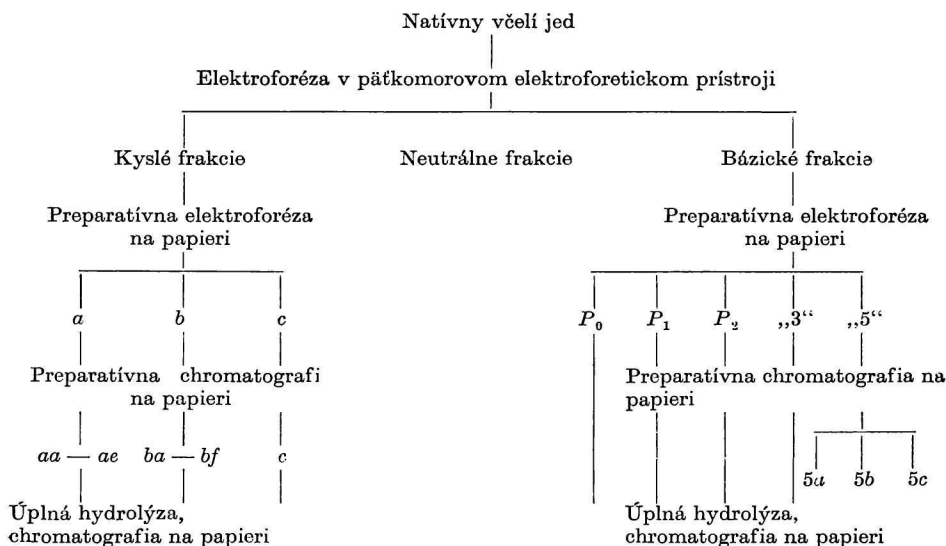
Papierová chromatografia hydrolýzátov

Hydrolýzáty, z ktorých sme nadbytočnú HCl odstránili trojnásobným odparením vo vákuovom exsikátore nad KOH, sme rozdeľovali na chromatografickom papieri Whatman

1 v zmesiach S_1 a S_5 a dvojrozmernou kombináciou zostupnej elektroforézy na papieri podľa O. Mikeša v jednom smere a chromatograficky v systéme S_1 v druhom smere.

Chromatogramy sme detegovali 0,5 % roztokom ninhydrínu v acetóne. Celkový priebeh rozdeľovania nízkomolekulových frakcií včelieho jedu zobrazuje schéma 1.

Schéma 1



Výsledky a diskusia

Pri štúdiu nízkomolekulových zložiek včelieho jedu sme sa predovšetkým zamerali na látky peptidického charakteru a na Pauly-pozitívne zložky. V prvom stupni izolácie sme použili metódu elektroforetického rozdeľovania v päťkomorovom elektroforetickom prístroji na zložku kyslú, neutrálnu a bázickú. Celkove sme rozdelili 5 g natívneho včelieho jedu. Ďalším rozdelením spojených sublimátov kyslej frakcie preparatívnou elektroforézou na papieri sme dokázali prítomnosť štyroch zložiek (obr. 1). Z nich dve frakcie putujúce približne s kyselinou glutamovou sa nám nepodarilo rozdeliť, preto sme ich vystrihli a eluovali spoločne. Jednotlivé frakcie sme označili takto:

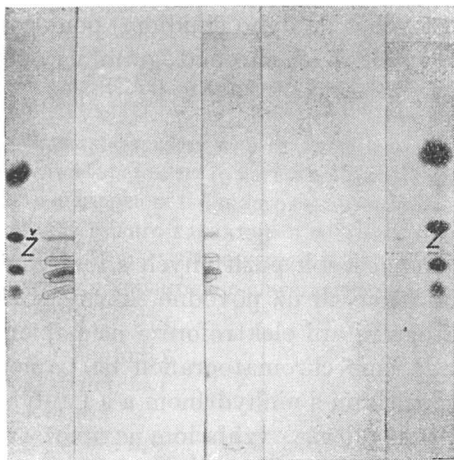
- a* — frakcia medzi neutrálnymi aminokyselinami a kyselinou glutamovou,
- b* — dvojfrakcia putujúca s kyselinou glutamovou,
- c* — frakcia putujúca s kyselinou asparágovou.

(Frakcie *a—c* zodpovedajú zložkám označeným v predchádzajúcom oznámení [1] ako 6a, 7, 7a.)

Zložky *a—c* sme ďalej rozdeľovali preparatívnou chromatografiou na papieri v systéme S_1 . Frakcia *a* sa rozdelila na 5 zložiek, označených *aa—ae* (obr. 2), dvojfrakcia *b* sa chromatograficky rozdelila na 6 frakcií označených *ba—bf*

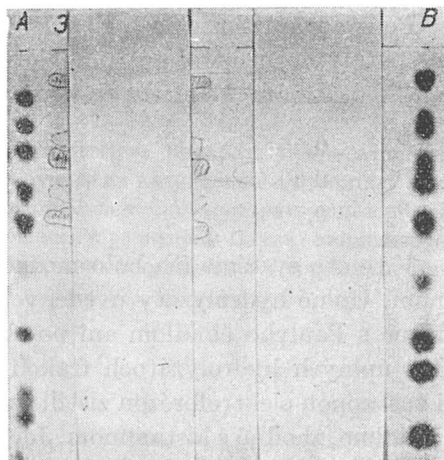
(obr. 3) a frakcia *c* bola i chromatograficky homogénna, putovala s kyselinou asparágovou a ako sa neskôr po úplnej hydrolýze ukázalo, bola s kyselinou asparágovou totožná. Z uvedených frakcií sme sa ďalej zaoberali len frakciami *aa*, *ac*, *ae*, *bb*, *be*, *bf*, keďže ostatné boli prítomné vo veľmi malých množstvách.

Po overení homogenity jednotlivých frakcií v systémoch S_2 , S_3 a S_4 sme



Obr. 1. Elektroforeogram mrazových sublimátov kyslej frakcie, izolovanej elektroforézou v pätkomorovom elektroforetickom prístroji.

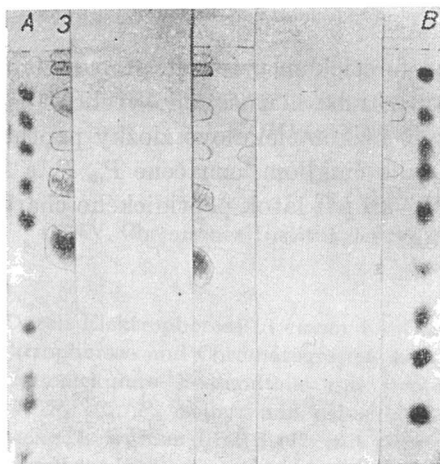
Ž — hydrolyzát želatíny ako štandard.



Obr. 2. Chromatogram preparatívneho rozdelenia frakcie *a*.

Ľavá polovica — vzorka; pravá polovica — slepý pokus.

A, B — štandardné zmesi aminokyselín.



Obr. 3. Chromatogram preparatívneho rozdelenia frakcie *b*.

Usporiadanie ako na obr. 2.

vykonali ich úplnú hydrolýzu a sledovali sme obsah aminokyselín. Ukázalo sa, že z uvedených frakcií päť zodpovedalo dipeptidom a tripeptidom a frakcia *be* voľnej kyseliny glutamovej.

Obsah aminokyselín jednotlivých frakcií bol nasledujúci:

<i>aa</i>	asp, ala
<i>ac</i>	asp, ala, pro
<i>ae</i>	glu, ala, val
<i>bb</i>	asp, val
<i>be</i>	glu
<i>bf</i>	glu, ala, pro
<i>c</i>	asp

Z bázeckej frakcie získanej po rozdelení včelieho jedu v päťkomorovom elektroforetickom prístroji sme po preparatívnom rozdelení elektroforézou a chromatografiou na papieri izolovali z katodickej frakcie „3“ (označenie podľa [1]) peptid, v ktorom sme po úplnej hydrolyze zistili aminokyseliny lyz, glu, arg, a z frakcie „5“ peptid obsahujúci lyz, glu, val. Z frakcie „5“ sa preparatívnou chromatografiou ďalej oddelil voľný lyzín a arginín.

Po izolovaní zložiek P_0 , P_1 a P_2 (pozitívnych s Paulyho činidlom) pomocou preparatívnej elektroforézy na papieri sme vykonali ich chromatografiu v systéme S_1 , v ktorom mali tieto R_F hodnoty:

P_0	0,55
P_1	0,60
P_2	0,70

V tomto systéme ich bolo možné oddeliť od látok pozitívnych s ninhydrínom. Úplné hydrolyzáty uvedených látok nedávali už pôvodné škvrny pozitívne s Paulyho činidlom ani po chromatografii ani elektroforéze na papieri. Pri úplných hydrolyzátoch frakcií P_1 a P_2 sme chromatografiou na papieri i zostupnou elektroforézou zistili škvrnu pozitívnu s ninhydrínom a s Paulyho činidlom, zhodnú s histamínom. Jej množstvo bolo však vzhľadom na množstvo eluovanej a hydrolyzovanej frakcie pomerne malé.

Technicky spolupracoval O. Miškovič.

Dakujeme členovi korešpondentovi dr. inž. Bořivojovi Keilovi z ÚOCHAB, Praha za mnohé rady a záujem o prácu.

Súhrn

Elektroforézou v päťkomorovom elektroforetickom prístroji, preparatívnou elektroforézou a chromatografiou na papieri sme z natívneho včelieho jedu izolovali a bližšie charakterizovali niektoré nízkomolekulové zložky peptidického charakteru a látky pozitívne s Paulyho činidlom, označené P_0 , P_1 a P_2 . Z anodickej frakcie včelieho jedu sme izolovali päť látok peptidického charakteru s nasledujúcim obsahom aminokyselín:

asp, ala
 asp, ala, pro
 glu, ala, val
 asp, val
 glu, ala, pro

Z katodickej frakcie sme izolovali dva peptidy s obsahom aminokyselín:

arg, glu, lyz
 glu, lyz, val

Látky pozitívne s Paulyho činidlom, označené ako P_0 , P_1 a P_2 , sme charakterizovali R_F hodnotami; v prípade zložiek P_1 a P_2 sme po úplnej hydrolýze zistili malé množstvo histamínu.

ХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

Л. Рексова, О. Марковиц

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук, Братислава

Электрофорезом в 5-ти камерном электрофоретическом аппарате препаративным электрофорезом на бумаге и хроматографией на бумаге из натурального пчелиного яда мы изолировали и ближе охарактеризовали некоторые низкомолекулярные компоненты пептидического характера и вещества проявляющиеся с реактивом Паули, наименованных P_0 , P_1 и P_2 . Из анодной фракции пчелиного яда мы изолировали 5 веществ пептидического характера с следующим содержанием аминокислот:

асп, ала
асп, ала, про
глу, ала, вал
асп, вал
глу, ала, про

Из катодной фракции мы изолировали два пептида, содержащие аминокислоты:

арг, глу, лиз
глу, лиз, вал

Вещества, проявляющиеся с реактивом Паули, обозначенных как P_0 , P_1 , P_2 мы охарактеризовали R_F значениями; у компонентов P_1 и P_2 после полного гидролиза мы обнаружили незначительное количество гистамина.

CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG EINIGER NIEDERMOLEKULARER KOMPONENTEN DES BIENENGIFTS

L. Rexová, O. Markovič

ČSAV, Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften,
Bratislava

Durch Elektrophorese in einem Fünfkammer-Elektrophoresegerät durch präparative Elektrophorese und Chromatographie auf Papier wurden aus nativem Bienengift einige niedermolekulare Bestandteile mit peptidischem Charakter und die Pauly-positive Stoffe P_0 , P_1 , P_2 isoliert und näher charakterisiert. Aus der anodischen Fraktion des Bienengifts wurden fünf Stoffe mit peptidischem Charakter und folgendem Gehalt an Aminosäuren isoliert:

asp, ala
asp, ala, pro

glu, ala, val
asp, val
glu, ala, pro

Aus der kathodischen Fraktion wurden zwei Peptide mit folgendem Gehalt an Aminosäuren isoliert:

arg, glu, lyz
glu, lyz, val

Die Pauly-positiven Stoffe, bezeichnet als P_0 , P_1 und P_2 wurden durch R_F -Werte charakterisiert; bei den Komponenten P_1 und P_2 wurden nach vollständiger Hydrolyse geringe Mengen von Histamin festgestellt.

LITERATÚRA

1. Markovič O., Rexová L., *Chem. zvesti* **17**, 676 (1963).
2. Mikeš O., *Chem. listy* **51**, 138 (1957); *Collection* **22**, 831 (1957).
3. Neumann W., *Naturwiss.* **41**, 322 (1954).
4. Neumann W., Habermann E., *Naturwiss.* **39**, 1 (1952).
5. Neumann W., Habermann E., *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **222**, 367 (1954).
6. Neumann W., Habermann E., Hansen H., *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **217**, 130 (1953).
7. Fischer F. G., Dörfel H., *Biochem. Z.* **324**, 465 (1953).
8. Fischer F. G., Neumann W. P., *Biochem. Z.* **324**, 447 (1953).
9. Grassmann W., Hannig E., *Z. physiol. Chem.* **296**, 30 (1954).
10. Grassmann W., Hannig E., *Oesterr. Chem. Ztg* **53**, 278 (1951).
11. Markovič O., Molnár L., *Chem. zvesti* **8**, 80 (1954).
12. Vaněček J., Meloun B., Šorm F., *Chem. listy* **51**, 1367 (1957).
13. Macho L., *Chem. zvesti* **11**, 175 (1957).
14. Reindl T., Hoppe W., *Ber.* **87**, 1103 (1954).
15. Jepson J. B., Smith J., *Nature* **172**, 1100 (1953).

Do redakcie došlo 15. 6. 1963

Adresa autorov:

*Dr. Ľubomíra Rexová, ČSAV, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.
Inž. Oskár Markovič, Výskumný ústav reumatologický, Piešťany.*