

Sledovanie zložiek v rozličných druhoch včelieho jedu*

O. MARKOVIČ, L. REXOŤA

ČSAV, Chemický ústav Slovenskej akadémie vied, Bratislava

Zavedenie včelieho jedu do lekárskej praxe ako prípravku vo forme injekcií alebo mastí malo za dôsledok potrebu objektívnych kritérií pre kontrolu suroviny, ako aj prípravkov včelieho jedu.

Stanovenie celkových bielkovín či už polarograficky alebo fotometricky, doplnené o stanovenie účinku zhodného s histamínom, ako opísali O. Markovič a L. Molnár [1], už požiadavkám výroby a najmä kontroly nepostačovalo. Javila sa potreba zaviesť novšie metódy, ktoré by umožnili podrobnejšie charakterizovať jednotlivé zložky včelieho jedu. (Súborný prehľad prác o izolácii a chemizme včelieho jedu podal O. Markovič [2].)

Pri sledovaní obsahových zložiek včelieho jedu sme vyšli z prác [3—9], ktoré sa zaoberajú rozdeľovaním včelieho jedu elektroforézou a chromatografiou na papieri, ako aj bližšou chemickou a farmakologickou charakterizáciou niektorých izolovaných frakcií.

Experimentálna časť

Na sledovanie obsahových zložiek včelieho jedu sme použili natívny včelí jed, získaný mechanicky metódou opísanou v [1]. V prvej fáze práce sme zásadne nesledovali obsahové zložky včelieho jedu, získaného extrakčnými metódami, resp. zrážaním kyselinou pikrovou, alebo takého, kde pri izolácii sa použil alkohol. Až v ďalšej fáze práce, pri porovnávaní viacerých druhov včelieho jedu, sme použili aj včelí jed z výrobných podnikov, kde nie je zaručená čisto mechanická izolácia. V tab. 1 je prehľad skúšaných včelích jedov i s uvedením spôsobu izolácie a s označením, aké sme používali počas celej práce pri popisoch chromatogramov a elektroforeogramov.

Na rozdeľovanie včelieho jedu sa najlepšie osvedčila metóda elektroforézy na papieri podľa [5, 6, 10, 11]. Títo autori používali veronalové, borátové a fosfátové tlmivé roztoky. Nám sa najlepšie osvedčila metóda zostupnej elektroforézy na papieri podľa [12] s pyridín—octanovým tlmivým roztokom. Výhoda tejto metódy oproti nízkovoltovej elektroforéze [10, 11] je v jej rýchlosti (1—2 hodiny), ako aj v používaní prchavých tlmivých roztokov. Za použitia tejto metódy sme mohli pri sledovaní kyslých zložiek včelieho jedu, ktoré obsahujú fosfor, použiť priamu detekciu na papieri, čo nie je možné za použitia fosforečnanového tlmivého roztoku, ktorý sa používa pri nízkovoltovej elektroforéze. Takisto pri preparačnom rozdeľovaní stačí eluát len odpariť a nie je potrebné odstraňovať soli, ktoré by sa doňho dostali z neprchavých tlmivých roztokov.

* Prednesené na I. celoštátnom sjazde Čs. spoločnosti biochemickej v Prahe 4. až 9. septembra 1957.

Pri rozdeľovaní včelieho jedu zostupnou elektroforézou sme používali pyridín—octanový tlmivý roztok o pH 4,8 a pracovali sme pri potenciálovom spáde 22—26 V/cm. Používali sme chromatografický papier Whatman 1 a Whatman 3 MM, obvykle na dĺžku. Vzorky včelieho jedu sme nanášali 20—25 cm od spodného okraja. Dosiahlo sa tak za 60 až 80 minút dobré rozdelenie jednotlivých zložiek bez toho, že by rýchlejšie sa pohybujúce frakcie doputovali príliš ďaleko k okraju papiera. Po elektroforetickom rozdelení sme vykonali detekciu 0,5 % acetónovým roztokom ninhydrínu, brómfenolovou modrou, amidočernou 10B, Sakaguchiho činidlom, Reindlovým činidlom [13], Paulyho činidlom

Tabuľka 1

Označenie včelích jedov použitých pri porovnávaní

Včelí jed, označenie pri pokusoch	Miesto a doba zberu (resp. pôvod)	Spôsob izolácie
<i>I</i>	Radošina, august 1953	mechanicky podľa [1]
<i>Ia</i>	Bojnice, august 1952	mechanicky podľa [1]
<i>II</i>	Radošina, september 1953	mechanicky podľa [1]
<i>III</i>	Radošina, september 1953	pri izolácii použitý alkohol
<i>IIIa</i>	Šamorín, október 1952	mechanicky podľa [1]
<i>IIIb</i>	Šamorín, jún 1952	pri izolácii použitý alkohol
<i>IV</i>	Slovakofarma, Hlohovec	zmes určená na <i>Virapin ung.</i>
<i>V</i>	Radošina, august 1955	pri izolácii použitý alkohol
<i>VI</i>	Slovakofarma, Hlohovec 1955	zmes na inj.
<i>VII</i>	Radošina, september 1955	mechanicky podľa [1]
<i>VIII</i>	Radošina, jún 1957	mechanicky podľa [1]
<i>IX</i>	Radošina, august 1957	mechanicky podľa [1]
<i>X</i>	firma Mack, Ulm 1951	obchodný prípravok
<i>XI</i>	Amsterodamsche Chimiefabrik 1951	obchodný prípravok
<i>XII</i>	firma Mack, Ulm (bez bližšieho označenia)	obchodný prípravok
<i>XIII</i>	Apisarthron, dr. Bell Co. Magdeburg	obchodný prípravok
<i>A</i>	Radošina, september 1952	pri izolácii použitý alkohol
<i>B</i>	Radošina, október 1952	pri izolácii použitý alkohol

Tabuľka 2

Obsah histamínu v jednotlivých druhoch
včelieho jedu

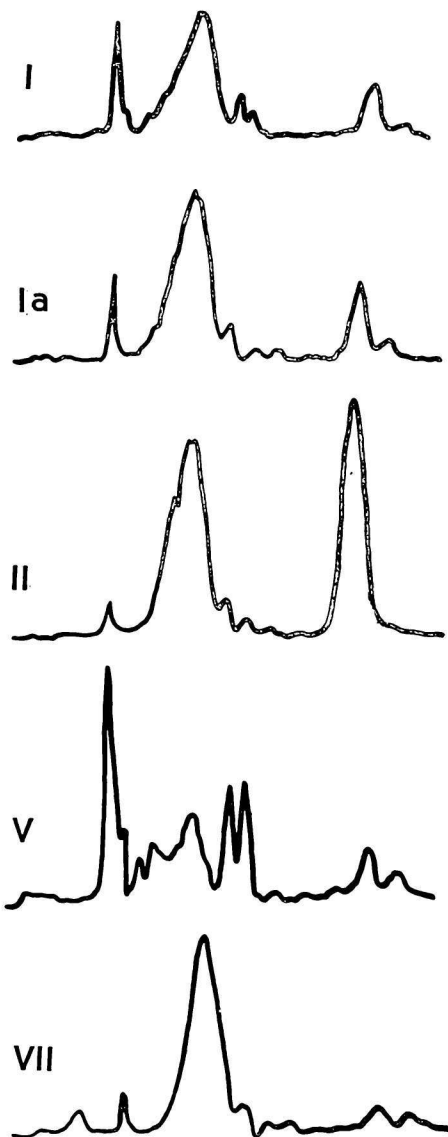
Včelí jed	mg% histamínu
<i>I</i>	1,05
<i>Ia</i>	0,70
<i>II</i>	1,57
<i>III</i>	1,33
<i>V</i>	0,88
<i>VII</i>	1,20
<i>VIII</i>	0,77
<i>IX</i>	0,93
<i>A</i>	0,64

a Hanes—Isherwoodovým čídnlom v modifikácii L. Machu [14]. V ďalšej práci sme na detekciu používali už len ninhydrín, Paulyho čídnlo a Hanes—Isherwoodovo čídnlo, pretože ostatné čídnlá neukázali viacej zložiek po rozdelení včelieho jedu.

Za účelom získania presnejšieho obrazu o kvantitatívnom zastúpení jednotlivých zložiek a ich porovnania s inými vzorkami včelieho jedu sme premerali negatívy, získané po odfotoografovaní elektroforeogramov detegovaných ninhydrínom, pomocou denzitometra (používali sme prístroj „Zeiss Schnellphotometer“, model II). Pracovali sme stále za tých istých podmienok (pri fotoografovaní elektroforeogramov i pri premeriavaní negatívov), takže sme mohli dobre porovnávať relatívne zastúpenie jednotlivých frakcií v rozličných vzorkách včelieho jedu. Na obr. 1 sú znázornené krivky získané po premeraní negatívov elektroforeogramov, na ktorých sú zjavné rozdiely medzi skúšanými vzorkami. Pri porovnávaní sme planimetrovali krivky prislúchajúce jednotlivým frakciám, čo nám pri rovnakých nanáškach vzoriek umožnilo vzájomné hodnotenie. Podobne sme v jednotlivých včelích jedoch stanovili i histamín. Použili sme metódu, ktorú opísal B. Keil [15], resp. metódu na kvantitatívne stanovenie aminokyselín pri zostupnej elektroforéze, ktorú použil O. Mikeš [12]. Po skončení zostupnej elektroforézy sme za vyššie uvedených podmienok uskutočnili detekciu pretiahnutím papiera v 1 % acetónovom roztoku ninhydrínu. Po 24 hodinách sme zdetegovaný elektroforeogram odfotografovali, negatívy premerali na denzitometri, získané krivky sme vyhodnotili planimetricky a vyhodnotili graf závislosti plochy krivky od množstva histamínu. Z grafu sme určili množstvo histamínu v jednotlivých nanáškach, prepočítali na histamín-bázu a na koncentráciu v mg %.

Diskusia

Elektroforeogramy včelieho jedu sa približne zhodovali s elektroforeogra-

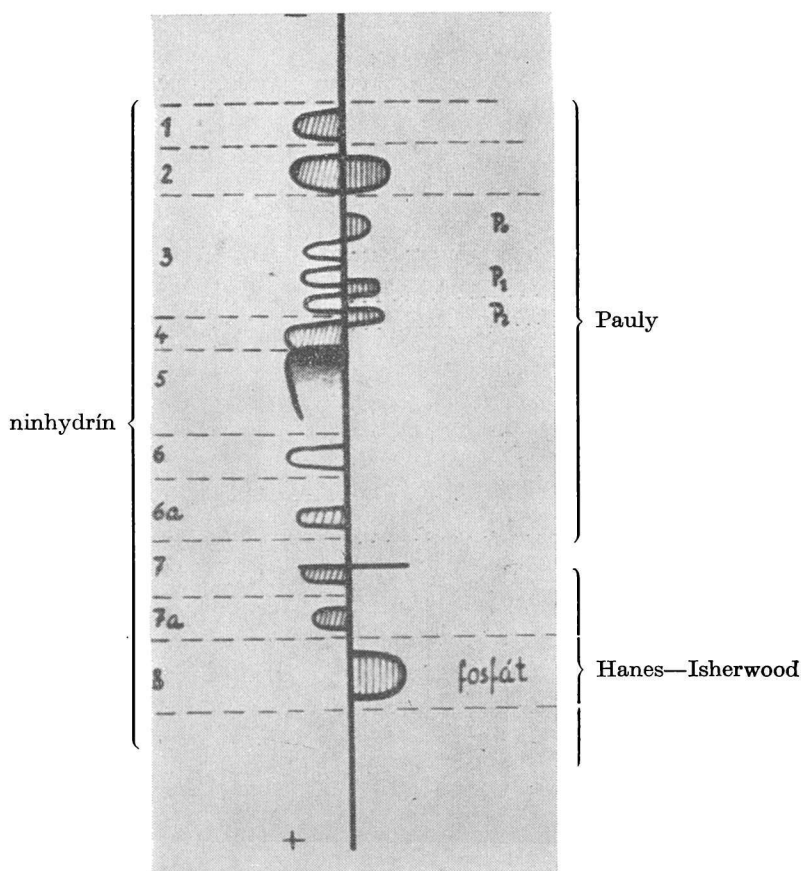


Obr. 1. Fotometrické vyhodnotenie obsahu jednotlivých zložiek v rozličných druhoch včelieho jedu.

Na osi úsečiek: posun negatívu od anodickej strany ku katodickej.

Na osi poradnic: intenzita sfarbenia.

mom, ktorý opísali W. Neumann a E. Habermann [5]. Títo autori uvádzajú osem frakcií, z ktorých identifikovali a farmakologickému preskúšanju podrobili histamín a frakcie označené ako F_0 , F_I a F_{II} . Po detekcii Paulyho činidlom sme zistili tri intenzívne sfarbené škvrny, ležiace na katodickej strane elektroforeogramu medzi bielkovinovými frakciami a histamínom, s popisom ktorých sme sa dosiaľ v literatúre nestretli. Označili sme ich P_0 , P_1 a P_2 . Okrem toho sme zistili na katodickej i na anodickej strane po detekcii ninhydrínom a Reindlovým činidlom škvrny peptidického charakteru. Obr. 2 ukazuje na kópii elektroforeogramu včelieho jedu jednotlivé zložky s označením, aké sme používali v ďalšej porovnávacej a izolačnej časti práce. Ľavá strana ukazuje obraz získaný po detekcii ninhydrínom, katodická strana pravej časti po

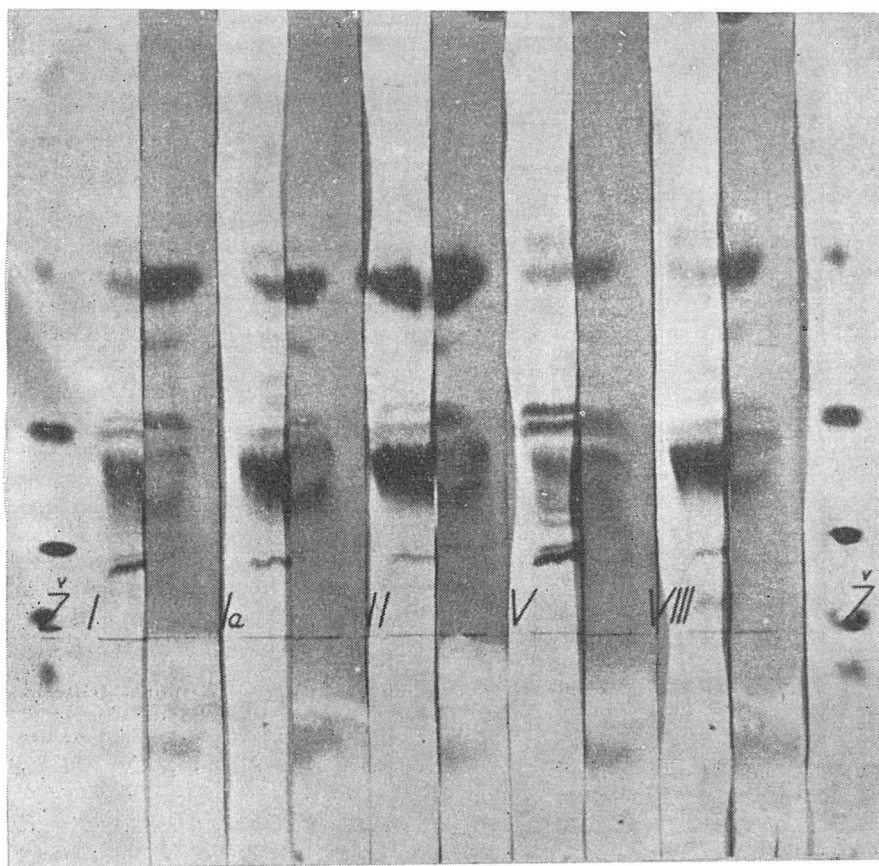


Obr. 2. Schéma elektroforeogramu včelieho jedu s označením jednotlivých zložiek a použitých detekčných činidiel. Vodorovná plná čiara značí miesto naniesenia vzorky.

detekcii Paulyho činidlom a anodická strana pravej časti po detekcii Hanes—
—Isherwoodovým činidlom.

Pri porovnávaní viacerých včelích jedov, líšiacich sa dobou, ako aj miestom zberu, sme zistili markantné rozdiely v jednotlivých zložkách. Za použitia uvedenej metódy sme zo skúšaných 18 vzoriek včelieho jedu nenašli ani dve, ktoré by poskytli úplne zhodné elektroforeogramy. Rozdiely boli v kvantitatívnom zastúpení jednotlivých zložiek, ako aj v tom, že niektoré frakcie neboli v niektorých skúšaných vzorkách vôbec prítomné (tab. 3).

Na obr. 3 je elektroforeogram niektorých druhov včelieho jedu; z jednotlivých vzoriek sme nanášali 3 mg na 5 cm čiary po rozpustení v redestilovanej vode.



Obr. 3. Elektroforeogram včelích jedov I, Ia, II, V, VIII.

Ž — hydrolyzáť želatíny a histamín, použité ako štandardy. Detegované ninhydrínom, Paulyho činidlom a Hanes—Isherwoodovým činidlom ako na obr. 2. Zapojenie — záporný pól k hornému, kladný pól k spodnému okraju papiera.

Tabuľka 3
Zastúpenie jednotlivých obsahových zložiek vo veľkých jedoch

	<i>I*</i>	<i>Ia*</i>	<i>II*</i>	<i>III</i>	<i>IIIa*</i>	<i>IIIb</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI*</i>	<i>VII*</i>	<i>VIII*</i>	<i>IX*</i>	<i>X</i>	<i>XI</i>	<i>XII</i>	<i>XIII</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
<i>1</i>	+	++	±	—	±	±	—	+	—	±	++	++	+	—	+	±	±	±
<i>2</i>	++	+	++	++	+ ¹⁾	++ ¹⁾	+ ¹⁾	+	+ ¹⁾	++	+	+	+ ¹⁾	— ¹⁾	+ ¹⁾	++ ¹⁾	+	+ ¹⁾
<i>3</i>	+	++	++	+	±	±	—	++	+	++	++	++	±	+	++	+	±	±
<i>P₀</i>	++	+	+	+	—	+	—	±	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>P₁</i>	++	±	++	++	—	—	—	++	+	±	—	—	+	—	+	—	±	—
<i>P₂</i>	++	++	++	++	++	±	±	++	±	++	++	++	++	±	+++	+	±	±
<i>4</i>	++	+	+	++	++	+	+	++	+	++	+	+	++	+	++	+	+	++
<i>5</i>	++	++	++	++	+	++	++	+	++	++	++	++	+	±	+	++	++	+
<i>6</i>	++	++	+	++	++	++	±	++	+	+	+	+	++	++	++	+	+	++
<i>6a</i>	±	+	±	±	±	—	—	++	±	±	++	++	+	—	+	±	±	+
<i>7</i>	+	±	±	±	+	—	±	+	—	±	±	+	+	—	±	—	—	++
<i>7a</i>	+	+	+	—	—	—	—	++	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—
<i>8</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++	++	+	++

Hviezdičkou označené veľie jedy sú natívne, mechanicky izolované.
Histamín (2) s indexom ¹⁾ dával netypickú škvrnu.

Po vyhodnotení elektroforeogramov 18 vzoriek včelieho jedu (tab. 1) sme zistili tieto rozdiely v zastúpení jednotlivých frakcií (označenie frakcií podľa obr. 2):

Najbázickejšia škvrna, ninhydrín-pozitívna, ležiaca nad histamínom, označená „1“, bola prítomná vo väčšine skúšaných vzoriek. Jej množstvo v jednotlivých vzorkách veľmi kolísalo; ak sme za 100 % považovali plochu získanú po planimetrickom vyhodnotení krivky najintenzívnejšej škvrny, boli výkyvy medzi skúšanými vzorkami až 70 %. Z 18 vzoriek včelieho jedu sme ju nezistili pri štyroch vzorkách. Zaujímavá je závislosť medzi škvrnou „1“ a histamínom (označený „2“): pri vzorkách, kde škvrna „1“ chýbala, resp. bola veľmi málo intenzívna, boli najvyššie hodnoty histamínu (vzorky II, III, VII — pozri tab. 2).

Histamín označený ako „2“ bol prítomný vo všetkých skúšaných vzorkách. Pri niektorých, kde neposkytoval typickú oválnu škvrnu, sme jeho vyhodnotenie nemohli uskutočniť. V skúšaných vzorkách sme stanovili histamín v množstve kolísajúcom od 0,64 mg% do 1,57 mg% (tab. 2). Relatívna šírka intervalu spoľahlivosti danej metódy stanovenia štandardu (pre $n = 7$) bola $l = 8,1$ %.

Tieto výsledky boli rámcove v zhode so stanoveniami histamínu na izolovanom morčacom čreve.

Látky pozitívne s Paulyho činidlom, označené ako P_0 , P_1 a P_2 , ležiace medzi histamínom a frakciou „4“, takisto neboli rovnako zastúpené vo všetkých vzorkách. Zložka P_2 bola prítomná vo všetkých skúšaných včelích jedoch, zložka P_1 sa nedala zistiť v 8 vzorkách a zložka P_0 v 11 vzorkách.

Vo frakcii označenej „3“ sme zistili ninhydrín-pozitívne látky, ktoré boli prítomné vo všetkých včelích jedoch.

Frakcie „4“, „5“ a „6“, pravdepodobne totožné s frakciami F_0 , F_I a F_{II} , ktoré opísal W. Neumann [4], boli prítomné vo všetkých skúšaných vzorkách, ich kvantitatívne zastúpenie však bolo rôzne.

Frakcie označené „6a“ a „7“, pozitívne s ninhydrínom a Reindlovým činidlom, javili rozdiely v kvantitatívnom zastúpení. Frakcia „7a“ bola prítomná len v piatich zo skúšaných 18 včelích jedov.

Frakcia „8“ pozitívna s Hanes—Isherwoodovým činidlom reagujúcim s fosfátmi bola prítomná vo všetkých skúšaných vzorkách.

Blížšou charakterizáciou peptidických zložiek včelieho jedu sa zaoberáme na inom mieste [16].

Súhrn

Metódou zostupnej vysokovoltovej elektroforézy na papieri za použitia pyridín—oetanového tlmivého roztoku o pH 4,8 a kvantitatívnym foto-

metrickým vyhodnotením elektroforeogramov sme porovnávali zloženie 18 druhov včelieho jedu, líšiacich sa miestom a dobou zberu, ako aj spôsobom izolácie. Okrem hlavných bielkovinových zložiek a histamínu sme zistili prítomnosť katodicky i anodicky putujúcich zložiek peptidického charakteru, troch Pauly-pozitívnych, katodicky putujúcich zložiek a zložku anodicky putujúcu, obsahujúcu fosfát. Pri jednotlivých včelích jedoch sme zistili značné rozdiely v kvantitatívnom zastúpení väčšiny komponentov a za prítomnosti Pauly-pozitívnych zložiek. Množstvo histamínu v jednotlivých včelích jedoch kolísalo od 0,64 mg% do 1,57 mg%.

ИЗУЧЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ В РАЗЛИЧНЫХ СОРТАХ ПЧЕЛИНОГО ЯДА

О. Маркович, Л. Рексова

ЧСАН, Химический институт Словацкой академии наук, Братислава

Методом нисходящего высоковольтного бумажного электрофореза с применением пиридинуксусного буферного раствора pH 4,8 и количественной фотометрической оценкой электроforeграмм сравнивалось содержание отдельных составных компонентов в 18 сортах пчелиного яда, отличающихся местом и временем сбора, а также способом выделения. В упомянутых сортах пчелиного яда было установлено, кроме главных белковых компонентов и гистамина, компонентов пептидного характера, передвигающихся к катоду и аноду, трех Паули-положительных компонентов,двигающихся к катоду, и компонента, содержащего фосфат,двигающегося к аноду. Отдельные сорта пчелиного яда содержали различные количества большинства компонентов и Паули-положительных компонентов. Содержание гистамина для отдельных сортов пчелиного яда изменялось от 0,64 мг% до 1,57 мг%.

UNTERSUCHUNG VON KOMPONENTEN VERSCHIEDENER BIENENGIFTARTEN

O. Markovič, L. Rexová

ČSAV, Chemisches Institut der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Bratislava

Mittels der Methode der absteigenden Hochspannungspapierelektrophorese, unter Verwendung des Pyridin-Acetat Puffersystems vom pH 4,8 und durch quantitative photometrische Auswertung der Elektropherogramme, wurde die Zusammensetzung von 18 Bienengiftarten unterschiedlicher Provenienz, Sammlungszeit und Isolierungsmethode verglichen. Ausser den wichtigsten eiweisshaltigen Komponenten und Histamin wurde die Anwesenheit von kathodisch und anodisch wandernden Komponenten mit peptidischem Charakter, drei Pauly-positiven kathodisch wandernden Komponenten und einer anodisch wandernden phosphathaltigen Komponente festgestellt. In einzelnen Bienengiften konnten beträchtliche Unterschiede in der quantitativen Vertretung der meisten Komponenten und in der Anwesenheit von Pauly-positiven Bestandteilen festgestellt werden. Der Histamingehalt einzelner Bienengifte schwankte von 0,64 mg% bis 1,57 mg%.

LITERATÚRA

1. Markovič O., Molnár L., *Chem. zvesti* **8**, 80 (1954).
2. Markovič O., *Farmakoterapeutické zprávy*, SPOFA, č. 6 (1960).
3. Neumann W., *Ber. der Physiol.-Med. Gesellschaft zu Würtzburg, Neue Folge* **66**, 166 (1956).
4. Neumann W., *Naturwiss.* **41**, 322 (1954).
5. Neumann W., Habermann E., *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **222**, 367 (1954).
6. Neumann W., Habermann E., *Naturwiss.* **39**, 286 (1952).
7. Neumann W., Habermann E., Hansen H., *Arch. exp. Pathol. Pharmacol.* **217**, 130 (1953).
8. Fischer F. G., Neumann W., *Biochem. Z.* **324**, 447 (1953).
9. Fischer F. G., Dörfel H., *Biochem. Z.* **324**, 465 (1953).
10. Grassmann W., Hannig K., *Österr. Chemiker-Ztg.* **53**, 278 (1952).
11. Grassmann W., Hannig K., *Z. physiol. Chem.* **296**, 30 (1954).
12. Mikeš O., *Chem. listy* **51**, 138 (1957); *Collection* **22**, 831 (1957).
13. Reindl T., Hoppe W., *Ber.* **87**, 1103 (1954).
14. Macho L., *Chem. zvesti* **11**, 175 (1957).
15. Keil B., *Chem. listy* **48**, 725 (1954); *Collection* **19**, 1006 (1954).
16. Róxová L., Markovič O., *Chem. zvesti* (v tlači).

Do redakcie došlo 25. 4. 1963

Adresa autorov:

Inž. Oskár Markovič, Výskumný ústav reumatologický, Piešťany.

Inž. Ľubomíra Rexová, ČSAV, Chemický ústav SAV, Bratislava, Dúbravská cesta.