

Über freie Aminosäuren im Gifte der Gelbbauchunke *Bombina variegata* L.

Von

H. Michl und **H. Bachmayer**

Aus dem Analytischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 28. Februar 1964)

In Unkengiften kommen 12 α -Aminosäuren, γ -Aminobuttersäure und 5-Hydroxytryptamin vor. Die Zusammensetzung des Aminosäuregemisches ist konstant und wird durch die aufgenommene Nahrung nicht beeinflusst.

Es werden Karten zur Dünnschichtchromatographie von mehr als 40 Aminosäuren und verwandten Verbindungen angegeben.

In tierischen Giften sind mehrfach freie Aminosäuren nachgewiesen worden. So fanden beispielsweise *Fischer* und *Bohn*^{1,2} in den Hautsekreten von *Grammostola mollicoma* und *Phoneutria fera*, beides Arachniden, über 20% freie Glutaminsäure und kleinere Mengen anderer Aminosäuren. Selten vorkommende Aminosäuren, wie Pipecolinsäure, waren im Gift von *Vespa germanica*³ und *Sceliphron caementarius*⁴ (Insekten) vorhanden.

Auch in den Hautsekreten einiger Amphibien traf man freie Aminosäuren an⁵⁻⁸. Ihre biologische Bedeutung ist unklar. Man weiß nicht, ob es sich dabei um regelmäßige im Gift auftretende Begleitstoffe konstanter Zusammensetzung oder von der Nahrung abhängige, etwa im Rahmen der Stickstoffexkretion ausgeschiedene, Verbindungen handelt. Über-

¹ *F. G. Fischer* und *H. Bohn*, Ann. Chem. **603**, 232 (1957).

² *F. G. Fischer* und *H. Bohn*, Z. physiol. Chem. **306**, 265 (1957).

³ *H. Michl*, Mh. Chem. **88**, 701 (1957).

⁴ *R. O'Connor* und *W. Rosenbrook*, Canad. J. Biochem. Physiol. **41**, 1943 (1963).

⁵ *G. Kiss* und *H. Michl*, Toxicon [Oxford] **1**, 33 (1962).

⁶ *H. Michl* und *H. Bachmayer*, Mh. Chem. **94**, 814 (1963).

⁷ *H. Michl* und *E. Kaiser*, Toxicon [Oxford], **1**, 175 (1963).

⁸ *J. L. Wittliff*, persönl. Mitt. (6. 11. 1962).

reichliche Fütterung einer Aminosäure an Unken und nachfolgende Analyse des Giftes sollte zumindest für diese Art eine Entscheidung ermöglichen.

Experimenteller Teil

Unkengift: Das „Melken“ der Unken wurde in einer früheren Arbeit geschildert⁵. Es wurde jedoch vor der Lyophilisierung die in der wäßrigen Lösung auftretende Trübung abfiltriert. Die Ausbeuten lagen dann bei 8–25 mg trockenem Gift pro gemolkener Unke.

Anreicherung der Aminosäuren: Eine 1,25proz. Lösung von lyophilisiertem Unkengift wurde bei 0–5° mit Aceton fraktioniert gefällt und dabei der Großteil hochmolekularer Substanzen entfernt. Der Überstand einer mit der 6fachen Menge Aceton gefällten Lösung enthielt nur mehr Aminosäuren, biogene Amine und Peptide 4a–7 (vgl. ⁶). Die Ausb. lag bei 20% des lyophilisierten Giftes. Die Abtrennung der Peptide erfolgte durch Chromatographie an Sephadex G-25 und wurde schon früher beschrieben⁶. Die Ausbeute an den niedermolekularen Substanzen war weniger als 10% des lyophilisierten Giftes.

Dünnschichtchromatographie: Die Platten wurden in üblicher Weise mit Kieselgel G (Merck) beschichtet und über Nacht an der Luft getrocknet. Ein längeres Lagern der Platten ist nicht ratsam, da sonst eine schnell wandernde, gelbe Zone verstärkt in Erscheinung tritt und den Nachweis schneller Aminosäuren stört. Als Lösungsmittel wurden die von *Fahmy*, *Niederwieser*, *Pataki* und *Brenner*⁹ angegebenen Systeme verwendet, u. zw. in der ersten Richtung CHCl_3 — CH_3OH —17proz. NH_3 wie 2:2:1 (v/v) und Phenol (vakuumdestilliert)— H_2O wie 3:1 (g/v) unter Zusatz von Äthylendiamintetraessigsäure in der zweiten Richtung.

Die Entwicklung erfolgte durch Besprühen mit einer Cu-hältigen Ninhydrinlösung nach ^{10, 11, 12}. Zur Identifizierung der einzelnen Flecke ist weniger der R_F -Wert geeignet als die relative Lage zu bekannten Substanzen.

Trennung von Leucin und Isoleucin: Diese Aminosäuren ließen sich gut nach *Hais* und *Horesovsky*¹³ auf einem mit H_3BO_3 — KCl —*ÄDTA*-Puffer von pH 8,4 imprägniertem Papier (SS 2043 b) durch Verteilen mit *t*-Butylalkohol und dem obigen Puffer (85:15, v/v) trennen.

Wie der Abbau mit L-Aminosäureoxydase (*Bothrops atrox*-Gift) zeigte, lagen die Leucine in der L-Form vor.

Hochvoltektrophorese: Diese erfolgte auf der von einem von uns beschriebenen Apparatur¹⁴. Das verwendete Papier war säuregewaschenes MN 2214, der Puffer Pyridin—Essigsäure—Wasser (1:1:98; v/v) von pH 4,7.

⁹ A. R. *Fahmy*, A. *Niederwieser*, G. *Pataki* und M. *Brenner*, *Helv. Chim. Acta* **44**, 2022 (1961).

¹⁰ M. *Brenner* und A. *Niederwieser*, *Experientia* [Basel] **16**, 378 (1960).

¹¹ E. D. *Moffat* und R. I. *Lytle*, *Anal. Chem.* **31**, 926 (1959).

¹² A. L. *Levy* und D. *Chung*, *Anal. Chem.* **25**, 396 (1953).

¹³ I. M. *Hais* und O. *Horesovsky*, *Chem. Listý* **48**, 549 (1954).

¹⁴ H. *Michl*, *Chromatogr. Rev.* **1**, 11 (1959).

Folgende Wanderungsgeschwindigkeiten (bez. auf Lysin) wurden beobachtet:

Tabelle 1

| Verbindung | R_{Lys} in Pyridinacetatpuffer pH 4,7 |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|
| β -Alanin | 0,22 |
| γ -Aminobuttersäure | 0,33 |
| Cadaverin | 2,05 |
| Glycinamid | 1,55 |
| Histamin | 2,1 |
| Leucinamid | 1,15 |
| Leucinmethylester | 1,15 |
| Ornithin | 1,1 |
| Putrescin | 2,1 |
| Tyramin | 1,08 |

Fütterungsversuche: 20 mg Aminosäure (z. B. β -Alanin, Lysin, Prolin, Tryptophan) wurden in 0,2 ml Sahne gelöst bzw. suspendiert und mittels einer Injektionspritze peroral in den Magen erwachsener, etwa 7 g schwerer Unken appliziert. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurde das Gift gewonnen und wie oben beschrieben auf freie Aminosäure aufgearbeitet.

Die Aminosäurezusammensetzung im Gift unbehandelter Tiere wurde über einen Zeitraum von 4 Jahren beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion

Die direkte Chromatographie eines entweißten Unkengiftes gab keine verlässlichen Ergebnisse, da niedermolekulare, ninhydrinpositive

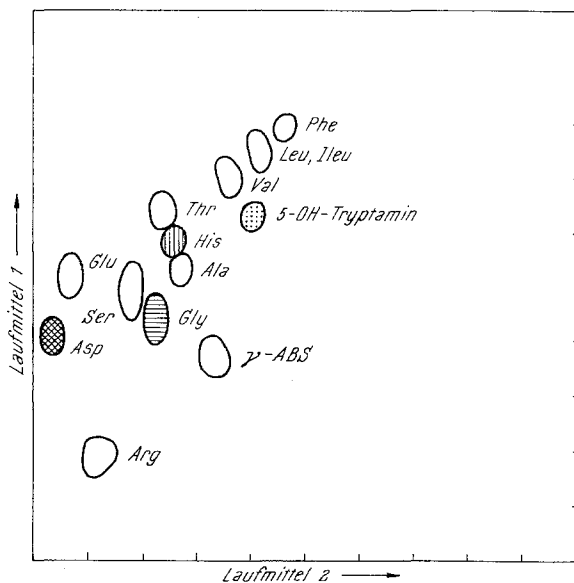


Abb. 1

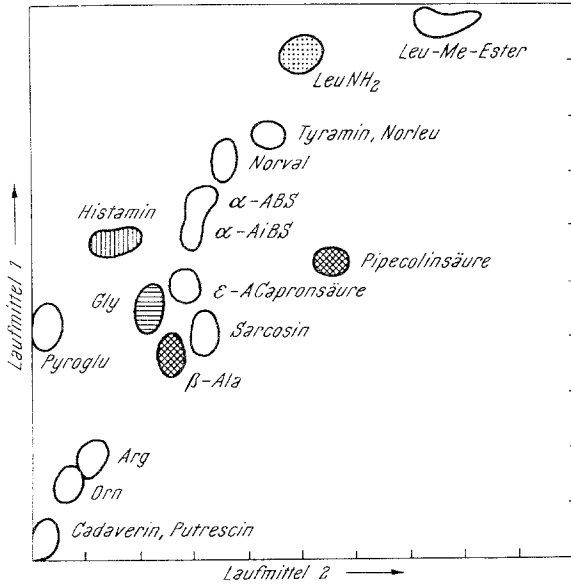


Abb. 2

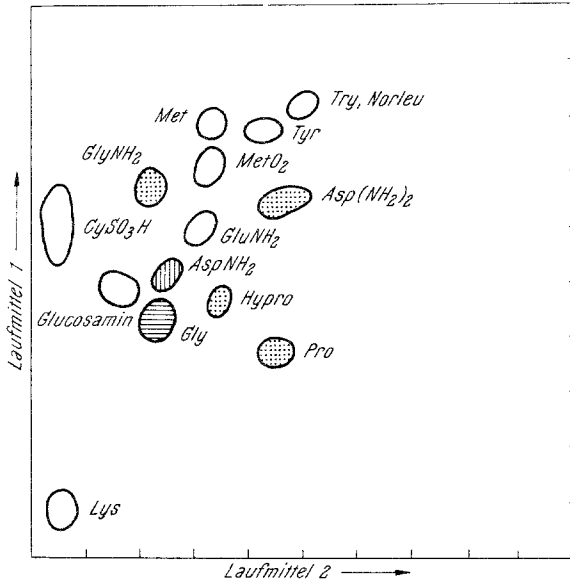


Abb. 3

Peptide das Bild stören. Die Aminosäuren mußten daher auf die im experimentellen Teil angegebene Weise angereichert werden. Die geringen aus Einzeltieren erhaltenen Mengen ließen sich dann gut dünnschichtchromatographisch trennen (Abb. 1). Zur sichereren Identifizierung der gefundenen Flecken wurden Karten von über 40 potentiell in tierischen Giften auftretenden Aminosäuren, biogenen Aminen und verwandten Verbindungen aufgenommen (Abb. 2 und 3) und das elektrophoretische Verhalten einiger dieser Stoffe untersucht (Tab. 1). Bei einigen proteino-genen Aminosäuren ergaben sich Verschiebungen in der relativen Lage gegenüber der Literatur⁹.

Wie Abb. 1 zeigt, sind im Unkengift 12 α -Aminosäuren, γ -Aminobuttersäure und 5-Hydroxytryptamin anzutreffen. Die gleichen Aminosäuren findet man auch nach Fütterung relativ großer Mengen von nicht im Gift vorkommenden Aminosäuren. Das durch die Hautdrüsen der Unken ausgeschiedene Aminosäuregemisch ist demnach von der aufgenommenen Nahrung unabhängig und stellt einen regelmäßigen Bestandteil der Unkengifte dar.

Dem U. S. Government wird für die Unterstützung dieser Arbeit herzlich gedankt.