Studien über Wespengift, I

Niedermolekulare Bestandteile des Giftblasenextraktes von *Paravespula vulgaris*

Studies on Wasp Venom, I

Low Molecular Weight Constituents of Venom Sac Extracts from *Paravespula vulgaris*

Hartmut Klein, Wittko Francke und Wilfried A. König*

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg,
Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

Z. Naturforsch. **36b**, 757–762 (1981); eingegangen am 11. Februar 1981

Wasp Venom, Gas Chromatography, Mass Spectrometry

Low molecular weight constituents of 3400 venom sacs of *Paravespula vulgaris* were extracted with water, diluted acetic acid, and methanol. After conversion to volatile derivatives carbohydrates, amino acids, fatty acids, other constituents of phospho lipids, and biogenic amines were identified by gas chromatography and mass spectrometry. Quantitative analysis was achieved for amino acids by amino acid analysis and for glucose by an enzymatic assay. Results are discussed with regard to biosynthesis of wasp toxins and phylogenetic aspects of hymenopteran venoms.

1. Einleitung

Die Gifte der sozialen Hautflügler (Honigbienen, Papierwespen, Ameisen) enthalten außer Polypeptiden mittleren Molekulargewichts und hochmolekularen Proteinen auch niedermolekulare Bestandteile zahlreicher Verbindungsklassen. Die verfügbaren Angaben über derartige Giftkomponenten sind bisher bruchstückhaft. Einzelangaben über bestimmte Verbindungsklassen finden sich in der Literatur für die Gifte etlicher Arten. Systematische Analysen einzelner Gifte im Hinblick auf niedermolekulare Komponenten mittels moderner Analysemethoden sind jedoch noch nicht publiziert worden. In dieser Arbeit werden Ergebnisse einer solchen systematischen Analyse unter weitestmöglicher Verwendung der Gaschromatographie und Massenspektrometrie vorgestellt. Untersuchungsobjekt war die Kurzkopfwespe *Paravespula vulgaris*, die in Mitteleuropa häufigste Vespidenart, Untersuchungsmaterial ein Giftblasenextrakt, das wegen der Probleme bei der Beschaffung reiner Vespidengifte in der Regel und auch noch in jüngster Zeit bei Untersuchungen über diese Gifte bevorzugte Ausgangsmaterial.

2. Gewinnung und Zerlegung des Giftblasenextraktes

Wespen wurden nach einem bereits bewährten Verfahren [1] durch Einfrieren ganzer Nester mit flüssiger Luft gefangen und bis zur Entnahme der Giftorgane in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Giftgewinnung wurden 5117 Tiere aus 3 Völkern benutzt, die anhand ihrer Kopfzeichnung als zur Art *Paravespula vulgaris* gehörig erkannt wurden. Darunter befanden sich neben Hunderten von Vollweibchen 1713 Männchen (33,6%). Den übrigen Tieren wurden 3391 intakte Giftblasen entnommen (66,4%).

Nach der Entnahme der Giftblasen wurden diese zunächst in Wasser ausgedrückt. Der wasserunlösliche Rückstand wurde anschließend in 1-proz. Essigsäure homogenisiert.

Durch Abtrennung der jeweils unlöslichen Anteile und Gefriertrocknung der Lösungen wurden insgesamt 3 Fraktionen erhalten:

Fraktion I = wasserlösliche Komponenten
(250 mg = 37%),

Fraktion II = in 1-proz. Essigsäure lösliche Komponenten (300 mg = 44%),

Fraktion III = in Wasser und in 1-proz. Essigsäure unlösliche Anteile (130 mg = 19%).

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Wilfried A. König.

Die Gesamtmenge von 680 mg entspricht einer Ausbeute von 0,2 mg Trockensubstanz pro Giftblase.

Aus dem Lösungsverhalten war zu schließen, daß sich in der Fraktion I die Hauptmenge der niedermolekularen Verbindungen, in der Fraktion II überwiegend höhermolekulare Verbindungen und in der Fraktion III die chitinhaltigen Giftblasenwände befanden.

Zur weiteren Abtrennung von Substanzen niedrigen Molekulargewichts wurden Teile der 3 Fraktionen in Methanol suspendiert. In Methanol lösten sich 70% der Fraktion I und je 10% der Fraktionen II und III. Im Fall der Fraktion I gelang die Trennung nach Molekulargewichten durch methanolische Extraktion nur unvollkommen. Etwa die Hälfte des methanollöslichen Anteils entfiel auf Peptide, die durch gaschromatographische Analysen nicht erfaßt wurden.

3. Qualitative Analysen

Methanolische Auszüge aller 3 Fraktionen wurden jeweils folgenden Derivatisierungsverfahren unterzogen:

- A) Zweistufige Umsetzung mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) und N-Methyl-N-trifluoracetyltrifluoracetamid (MBTFA) zur Untersuchung auf biogene Amine [2, 3].
- B) Zweistufige Reaktion mit methanolischer HCl-Lösung und Hexafluoracetanhydrid in Dichlormethan zur Untersuchung auf Aminosäuren [4].

Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden an Glaskapillaren gaschromatographisch und im Anschluß daran massenspektrometrisch untersucht (GC/MS-Technik, EI-70 eV, CI/Isobutan [5]).

Tab. I. GC/MS-Nachweise niedermolekularer Komponenten des *Paravespula vulgaris*-Giftblasenextraktes.

Substanz	identifiziert als	durch GC-Vergleich	EI-MS	CI-MS
Glucose	Penta-O-TMS-Derivat	+	+	+
	Tetra-O-TFA-methylglucosid	+	+	+
Fructose	Penta-O-TMS-Derivat	+	+	+
Glycin	N-TFA-methylester	+	+	+
Alanin	N-TFA-methylester	+	+	+
Valin	N-TFA-methylester	+	+	+
Leucin	N-TFA-methylester	+	+	+
Isoleucin	N-TFA-methylester	+	+	+
Prolin	N-TFA-methylester	+	+	+
Phenylalanin	N-TFA-methylester	+	+	+
Serin	N,O-bis-TFA-methylester	+	+	+
Threonin	N,O-bis-TFA-methylester	+	+	+
Asparaginsäure	N-TFA-dimethylester	+	+	+
Glutaminsäure	N-TFA-dimethylester	+	+	+
Lysin	N,N'-bis-TFA-methylester	+	+	+
Histamin	N ¹ -TFA-N ^ω -bis-TMS-Derivat	+	+	
Serotonin	N ¹ ,O-bis-TMS-N ^ω -TFA-Derivat	+	+	
Ethanolamin	N,O-bis-TFA-Derivat	+	+	+
Glycerin	Tris-O-TMS-Derivat	+	+	+
	Tris-O-TFA-Derivat	+	+	+
Phosphat	Phosphorsäuretris-TMS-ester		+	
Cholesterin	O-TFA-Derivat	+	+	+
Laurinsäure	Methylester	+	+	
Myristinsäure	Methylester	+	+	+
Palmitinsäure	Methylester	+	+	+
	TMS-ester	+	+	+
Stearinsäure	Methylester	+	+	+
Arachinsäure	Methylester	+	+	+
Behensäure	Methylester	+	+	+
Lignocerinsäure	Methylester	+	+	
Palmitoleinsäure	Methylester	+	+	+
Ölsäure	Methylester	+	+	+
	TMS-ester	+	+	+
Linolsäure	Methylester	+	+	+
Linolensäure	Methylester	+	+	+

In den nach Methode A derivatisierten Extrakten traten, wie erwartet, biogene Amine in Form ihrer TFA/TMS-Derivate auf. Hauptkomponenten dieser Extrakte waren jedoch die TMS-Derivate von Glucose und Fructose [6], höheren Fettsäuren, Glycerin und Phosphorsäure.

Als Komponenten der nach Methode B derivatisierten Extrakte wurden die trifluoracetylierten Methylester einer großen Anzahl Aminosäuren [4], eine Serie gesättigter und ungesättigter höherer Fettsäuremethylester sowie die N- bzw. O-TFA-Derivate des Ethanolamins und des Cholesterins identifiziert. Die schon als TMS-Derivat identifizierte Glucose trat als O-TFA-Derivat ihres Methylglycosids [7] auf, ebenso das schon als TMS-Derivat identifizierte Glycerin in Form seines TFA-Derivates.

Die Monosaccharide und Aminosäuren waren fast quantitativ in der Fraktion I (in Spuren auch in der Fraktion II) enthalten. Die Fettsäuren traten in den Fraktionen II und III auf, Glycerin und Ethanolamin in allen 3 Fraktionen, Histamin, Serotonin und Phosphat nur in der Fraktion II und Cholesterin nur in der Fraktion III.

Die anhand von Massenspektren ihrer Derivate als Bestandteile des Giftblasenextraktes identifizierten Substanzen sind in Tab. I zusammengefaßt. Zur zusätzlichen Absicherung der Identifizierungen wurden alle Naturstoffderivate gaschromatographisch mit synthetischen Derivaten verglichen. Die gaschromatographische Untersuchung der Aminosäuren in Form ihrer trifluoracetylierten Isopropylester an einer optisch aktiven stationären Phase (Chirasil-val) [8] ergab in allen Fällen die L-Konfiguration.

4. Quantitative Analysen

Die Ergebnisse der GC/MS-Analysen zeigen, daß der Giftblasenextrakt größere Mengen an Glucose, freien Aminosäuren und freien Fettsäuren neben geringeren Mengen anderer niedermolekularer Verbindungen enthält.

Die quantitative Bestimmung der freien Glucose erfolgte mit Hilfe des Glucoseoxidase/Peroxidase-Verfahrens unter Verwendung des Diammoniumsalzes der 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-sulfonsäure-6) als Redoxindikator [9]. Da durch GC/MS-Analysen sowohl in Fraktion I als auch in Fraktion II Glucose nachgewiesen werden konnte, wurden methanolische Auszüge beider Fraktionen

der enzymatischen Analyse unterworfen. Dabei zeigten sich Glucosegehalte von 16,5% der Fraktion I und lediglich 0,1% der Fraktion II. Bezogen auf die Gesamtmasse der Giftblasentrockensubstanz (einschließlich der Giftblasenwände) lag der Glucosegehalt somit bei 6,1%.

Die quantitative Bestimmung der ebenfalls nahezu ausschließlich auf die Fraktion I beschränkten freien Aminosäuren wurde in einem automatischen Aminosäureanalysator mit *o*-Phthalaldehyd als Nachweisreagenz [10] und fluoreszenzspektrophotometrischer Detektion durchgeführt. Das mit diesem Verfahren nicht erfaßbare Prolin wurde gaschromatographisch quantifiziert. Aufgrund des Elutionsverhaltens bei der Ionenaustauschchromatographie läßt sich über die durch GC/MS definitiv identifizierten Aminosäuren hinaus noch die Anwesenheit von β -Alanin, γ -Aminobuttersäure, Tyrosin, Methionin, Cystin, Taurin, Histidin, Arginin sowie Ornithin im Giftblasenextrakt vermuten. Die ermittelten Amino-

Tab. II. Freie Aminosäuren im *Paravespula vulgaris*-Giftblasenextrakt.

	% der Trockensubstanz
Glycin	0,07
Alanin	0,44
Valin	0,12
Leucin	0,27
Isoleucin	0,13
β -Alanin	0,02
γ -Aminobuttersäure	0,02
Prolin	0,73
Phenylalanin	0,18
Tyrosin	0,08
Serin	0,33
Threonin	0,05
Methionin	0,06
Cystin	0,03
Taurin	0,31
Asparaginsäure	0,02
Glutaminsäure	0,39
Ornithin	Spur
Lysin	0,11
Histidin	0,11
Arginin	0,24

säuregehalte sind in Tab. II zusammengefaßt. Prolin, Alanin und Glutaminsäure sind unter den freien Aminosäuren des *Paravespula vulgaris*-Giftblasenextraktes am stärksten vertreten. Daneben entfallen auch auf Serin, Taurin, Leucin und Arginin noch beträchtliche Anteile. Der Anteil aller freien Aminosäuren liegt bei 10,1% der Fraktion I und bei 3,7% der Gesamttrockensubstanz.

Glucose und freie Aminosäuren repräsentieren damit zusammen rund 25% der Fraktion I und rund 10% der gesamten Giftblasentrockensubstanz. Der Gehalt an freien Fettsäuren kann nur abgeschätzt werden, dürfte aber ebenfalls erheblich sein, wobei Palmitinsäure, Ölsäure und Linolsäure am stärksten vertreten sind.

5. Diskussion

Als Bestandteile des *Paravespula vulgaris*-Giftes aus dem niederen Molekulargewichtsbereich wurden bisher Histamin, Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, und Adrenalin beschrieben [11, 12]. Ihre Anteile an der Gift- bzw. Giftblasentrockensubstanz werden mit ca. 1% für Histamin, 0,1% für Serotonin und mehr oder weniger erheblich unter 0,1% für die Catecholamine angegeben.

Die Nachweise des Histamins und Serotonins konnten massenspektrometrisch bestätigt werden, die Catecholamine konnten dagegen nicht gefunden werden. Als denkbare Erklärungen dafür kommen der Verlust dieser oxidationsempfindlichen Substanzen vor der Derivatisierung oder die Überlagerung ihrer Derivate durch die Vielfalt anderer Substanzen hoher Konzentration, insbesondere Kohlenhydratderivate, im Gaschromatogramm in Frage.

Die Kohlenhydrat- und Aminosäuregehalte des Giftes übersteigen die Anteile der biogenen Amine bei weitem. Indizien für das Auftreten von Kohlenhydraten in Vespidengiften wurden bereits früher beobachtet [13]. Allerdings fehlten bisher verlässliche Angaben über den Kohlenhydratgehalt von Vespidengiften. Auch das Vorkommen freier Aminosäuren im Gift von *Paravespula vulgaris* wurde ohne Angabe von Details bereits früher erwähnt [14]; detaillierte Analysen freier Aminosäuren wurden bisher aber nur für den *Vespa orientalis*-Giftblasenextrakt beschrieben [15].

Die Mengenverhältnisse der einzelnen freien Aminosäuren im Gift von *Vespa orientalis* entsprechen weitgehend den hier für *Paravespula vulgaris* berichteten. Insbesondere stimmen beide Gifte hinsichtlich der Spitzenstellung von Prolin, Alanin und Glutaminsäure unter den freien Aminosäuren überein. Das vorherrschende Auftreten gerade jener Aminosäuren, die hauptsächlich das Propeptid des Bienengift-Haupttoxins Melittin aufbauen [16], dessen extrazellulärer Abbau zum freien Toxin vermutet wird [17], legt nahe, daß auch Peptidtoxine der Vespidengifte extrazellulär aus ähnlich struk-

turierten Protoxinen freigesetzt werden. Das nahezu völlige Fehlen der entsprechenden freien Aminosäuren im *Apis mellifera*-Gift [18] und ihr Auftreten in den Giften zweier Vespiden verschiedener Gattungen läßt darüber hinaus an einen Rückgewinnungsmechanismus für die beim Protoxinabbau freigesetzten Aminosäuren in den Giftapparaten denken, der bei der hochentwickelten Honigbiene quantitativ arbeiten dürfte, bei den stammesgeschichtlich älteren Vespiden dagegen noch nicht gleichermaßen perfektioniert wäre.

Der Kohlenhydratgehalt des *Paravespula vulgaris*-Giftes, der qualitativ (Glucose, Fructose) demjenigen des *Apis mellifera*-Giftes [19] entspricht, ihn quantitativ jedoch erheblich übersteigt, könnte als phylogenetisches Relikt jener Entwicklungsstufe aufgefaßt werden, auf der die Giftdrüse noch Teil eines Legeapparates war. Der quantitative Unterschied zwischen Wespen- und Bienengift wäre dann als Zeichen einer Rückbildung der Kohlenhydratsekretion in den Giftdrüsen anzusehen.

Während die identifizierten Monosaccharide und Aminosäuren in den gefundenen Mengen nur aus dem Gift selbst stammen und die Giftblasenwände zu ihrem Pool allenfalls vernachlässigbare Beiträge liefern können, sind bezüglich der identifizierten Lipide keine entsprechend eindeutigen Aussagen möglich. Das Vorkommen freien Cholesterins in Vespidengewebe ist bekannt [20], allerdings sind verschiedentlich Indizien für das Auftreten von Steroiden auch in Hautflüglergiften beobachtet worden [19, 21, 22]. Die freien Fettsäuren könnten zum Teil ebenfalls aus den Giftblasenwänden stammen, doch dürften die hauptsächlich vertretenen C₁₆- und C₁₈-Säuren auch echte Giftbestandteile sein.

Zytochemische Nachweise freier Fettsäuren in Sekretgranula der *Vespa orientalis*-Giftdrüse [23] stützen diese Annahme. Phospholipide wurden ebenfalls zytochemisch in Sekretgranula der *Vespa orientalis*-Giftdrüse nachgewiesen [23]. Falls die aus dem Giftblasenextrakt identifizierten Phospholipidkomponenten Glycerin, Ethanolamin und Phosphorsäure nicht zufällig nebeneinander auftreten, sondern echte Spaltprodukte sezernierter Phospholipide sein sollten, wirft dies ein neues Licht auf die Enzymausstattung des *Paravespula vulgaris*-Giftes. Eine vollständige Zerlegung sezernierter Phospholipide würde zusätzlich zum bekannten Phospholipase-A- und -B-Gehalt dieses Giftes [24, 25] auch eine Phosphatase fordern. Phosphatasegehalte sind

bereits für die Gifte einiger nordamerikanischer Vespiden (*Polistes exclamans* und *Paravespula*-Spezies) [27, 28] sowie für Bienen- (*Apis mellifera*) [26–28] und Ameisengift (*Pogonomyrmex badius*) [29] beschrieben worden.

Die Gesamtheit der bisher gaschromatographisch erfaßten und durch Massenspektren identifizierten Bestandteile stellt etwa 1/6 der *Paravespula vulgaris*-Gifttrockensubstanz dar. Der weitaus größere Teil der Gifthinhaltsstoffe bleibt somit weiteren Untersuchungen vorbehalten. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen anderer Hautflügler- und speziell Vespidengifte ist zu schließen, daß es sich bei dem bislang nicht identifizierten Anteil des Giftes von *Paravespula vulgaris* um ein Gemisch zahlreicher Peptide und Proteine handelt, unter denen sich neben den schon erwähnten Enzymen und einer Hyaluronidase [24, 30] auch Substanzen mit Kininaktivität befinden [11, 31, 32].

6. Experimentelles

3391 sorgfältig von anhängenden Geweben, insbesondere den Giftdrüsen, befreite und zwischen Entnahme und Aufarbeitung bei 248 K gelagerte Giftblasen wurden in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit Teflon-Pistill (Braun, Melsungen) bei 275 K zunächst 5-mal in je 20 ml bidest. Wasser ausgequetscht. Die wäßrigen Lösungen wurden abgehoben, 20 min mit 5000 g zentrifugiert, vereinigt und lyophilisiert (Fraktion I). Die ausgequetschten Giftblasen und die von den wäßrigen Lösungen abzentrifugierten Niederschläge wurden anschließend in 25 ml 1-proz. (v/v)-Essigsäure homogenisiert und 20 min bei 5000 g zentrifugiert. Der dabei anfallende Niederschlag wurde erneut mit 25 ml 1-proz. Essigsäure homogenisiert und zentrifugiert, die beiden Überstände vereinigt, mit 50 ml Wasser verdünnt und lyophilisiert (Fraktion II). Das sowohl in Wasser als auch verdünnter Essigsäure unlösliche Material wurde in 100 ml Wasser suspendiert und ebenfalls lyophilisiert (Fraktion III).

Für die qualitativen GC/MS-Analysen wurden je 20 mg der Fraktionen I, II und III 1 h bei 295 K mit je 3 ml Methanol digeriert. Nach Zentrifugation mit 5000 g während 20 min wurden die methanolischen Lösungen abgehoben, in die Derivatisierungsgefäße überführt und im N₂-Strom vom Lösungsmittel befreit. Für die quantitativen Glucoseanalysen wurden 5 mg der Fraktion I und 20 mg der Fraktion II mit je 3 ml Methanol in gleicher Weise extrahiert, zur quantitativen Aminosäureanalyse 5 mg der Fraktion I 2-mal mit je 3 ml Methanol.

Alle Derivatisierungen erfolgten in 2-ml-Schraubdeckelgläsern mit Teflondichtungen. Zur Derivatisierung nach Methode A wurden die Rückstände

methanolischer Extrakte von jeweils 20 mg der Fraktionen I, II und III mit 100 µl Acetonitril und 150 µl MSTFA (Macherey & Nagel, Düren) 30 min auf 353 K und nach Zugabe von 80 µl MBTFA (Merck, Darmstadt) nochmals 10 min auf 353 K erhitzt. Zur Derivatisierung nach Methode B wurden entsprechende Extrakte jeweils 1 h mit 1 ml 1,25 N methanolischer HCl-Lösung auf 363 K erhitzt.

Nach Entfernung des Reagenzes im N₂-Strom wurden 300 µl Dichlormethan und 100 µl Hexafluoracetanhydrid zugesetzt und 30 min bei 295 K stehen gelassen. Anschließend wurde 5 min auf 356 K erhitzt, abgekühlt, Lösungsmittel und Reagenzüberschuß im N₂-Strom entfernt und die Produkte in 50 µl Dichlormethan aufgenommen. Die zur Bestimmung der Aminosäurekonfiguration und zur gaschromatographischen Quantifizierung des Prolins benötigten N-TFA-Isopropylester entstanden auf entsprechende Weise durch Erhitzen mit 1 ml 1,5 N isopropanolischer HCl-Lösung während 1 h auf 373 K und anschließende Trifluoracetylierung mit 150 µl Hexafluoracetanhydrid in 500 µl Dichlormethan.

Flüchtige Derivate niedermolekularer Giftkomponenten wurden mittels eines Fractovap 2101 AC-Gaschromatographen mit Elektrometer Mod. 180 und Temperaturprogrammer Mod. 210 (Carlo Erba Strumentazione, Mailand) an folgenden Glaskapillarsäulen untersucht: SE-30, 25 m × 0,3 mm (Franzen-Analysentechnik, Bremen) und Chirasil-val, 28 m × 0,3 mm (selbstgefertigt). Trägergas: Wasserstoff. Trägergaseingangsdruck: 690 mb. Temperaturprogramme: 353–513 K, 3 K/min für SE-30; 358–463 K, 2 min isotherm, 2 K/min für Chirasil-val. Injektortemperaturen: 543 K für SE-30, 493 K für Chirasil-val. Detektion: FID.

Massenspektren wurden mit einer GC/MS-Kopplung HP 5985 A (Hewlett Packard) mit SE-30-Glaskapillare (Trägergas: Helium) aufgenommen. Ionenquellentemperatur: 473 K. Ionisierungsbedingungen: Elektronenstoßionisation, 70 eV; Chemische Ionisation, Reaktandgas Isobutan, Reaktandgasdruck $2 \cdot 10^{-5}$ mb.

Zur quantitativen Analyse des Glucosegehaltes wurden die Rückstände methanolischer Auszüge aus 5 mg der Fraktion I und 20 mg der Fraktion II in 1 ml bzw. 500 µl bidest. Wasser aufgenommen. Jeweils 100 µl dieser Lösungen wurden mit 1 ml einer 5 mM Uranylacetat- und 0,9-proz. Natriumchloridlösung gemischt und die gefällten Peptide abzentrifugiert. 200 µl des peptidfreien Überstandes wurden anschließend mit 5 ml einer 2 mM Lösung des 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzothiazolinsulfonsäure-6)-diammoniumsalzes mit 50 U Glucoseoxidase und 5 U Peroxidase (Boehringer, Mannheim) 40 min bei 298 K inkubiert.

Die Extinktion des dabei gebildeten Farbstoffes wurde mit einem MK 40-Photometer (Riele, Berlin) bei 578 nm gegen den Leerwert eines glucosefreien Ansatzes gemessen. Als Eichstandard diente eine Glucoselösung 91 mg/l.

Zur quantitativen Bestimmung der freien Aminosäuren wurde der Rückstand eines methanolischen Auszuges aus 5 mg der Fraktion I in 5 ml Natriumcitrat/HCl-Puffer pH 1,8 aufgenommen. Pro Durchgang wurden jeweils 100 µl dieser Lösung auf einem Biotronic-LC-6000-Aminosäureanalysator mit Durum DC-6 A-Säule, 27 × 0,6 cm und Spectra-Physics-Autolab-I-Integrationssystem analysiert. Als Eichstandard diente eine 5-mM-Lösung aller gemessenen Aminosäuren. Zur Bestimmung des Prolingehaltes wurden die FID-Signale der Aminosäure-N-TFA-isopropylester mit dem Datensystem eines Spectra-Physics-SP-8000-HPLC-Gerätes integriert. Durch Vergleich mit Standardgemischen wurde daraus das

Prolin/Alanin-Verhältnis und mit diesem und dem aus der Aminosäureanalyse bekannten Alaningehalt der Prolingehalt ermittelt.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit (Projekt KO 608/4) sowie Herrn M. Preuß, Universität Hamburg, für die Mithilfe beim Präparieren der Giftdrüsen. Herrn Prof. Dr. E. Bayer, Universität Tübingen, sind wir für die Bereitstellung von Chirasil-val, Herrn Dr. W. Michaelis und Herrn J. Voigt, Universität Hamburg, für die Durchführung der Aminosäureanalysen zu Dank verpflichtet.

-
- [1] G. Hindorf, Dissertation, Hamburg 1979.
 - [2] M. Donike, J. Chromatogr. **103**, 91 (1975).
 - [3] M. Donike, R. Gola u. L. Jaenicke, J. Chromatogr. **134**, 385 (1977).
 - [4] E. Gelpi, W. A. König, J. Gibert u. J. Oro, J. Chromatographic Sci. **7**, 604 (1969).
 - [5] W. J. Richter u. H. Schwarz, Angew. Chem. **90**, 449 (1978).
 - [6] D. C. De Jongh, T. Radford, J. D. Hribar, S. Hannesian, M. Bieber, G. Dawson u. C. C. Sweeley, J. Am. Chem. Soc. **91**, 1728 (1969).
 - [7] W. A. König, H. Bauer, W. Voelter u. E. Bayer, Chem. Ber. **106**, 1905 (1973).
 - [8] H. Frank, G. J. Nicholson u. E. Bayer, Angew. Chem. **90**, 396 (1978).
 - [9] W. Werner, H.-G. Rey u. H. Wielinger, Z. Anal. Chem. **252**, 224 (1970).
 - [10] M. Roth, Anal. Chem. **43**, 880 (1971).
 - [11] R. Jaques u. M. Schachter, Brit. J. Pharmacol. **9**, 53 (1954).
 - [12] J. Ishay, Z. Abraham, Y. Grunfeld u. S. Gitter, Comp. Biochem. Physiol. **48 A**, 369 (1974).
 - [13] G. Abrahams, Dissertation, Würzburg 1955.
 - [14] E. Kaiser u. H. Michl, Die Biochemie der tierischen Gifte, Wien, Franz Deuticke 1958.
 - [15] R. Ikan u. J. Ishay, Comp. Biochem. Physiol. **44 B**, 949 (1973).
 - [16] G. Suchanek, G. Kreil u. M. A. Hermodson, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **75**, 701 (1978).
 - [17] G. Kreil, Naturwiss. Rundschau **32**, 358 (1979).
 - [18] D. A. Nelson u. R. O'Connor, Can. J. Biochem. **46**, 122 (1968).
 - [19] R. O'Connor, G. Henderson, D. Nelson, R. Parker u. M. L. Peck, Proc. 1st Intern. Symp. Anim. Tox. (Hrsg. F. E. Russel u. P. R. Saunders), 17 (1967).
 - [20] R. Ikan u. J. Ishay, Steroids **6**, 101 (1965).
 - [21] C. Tetsch u. K. Wolff, Biochem. Zeitschr. **288**, 126 (1936).
 - [22] W. Rosenbrook u. R. O'Connor, Can. J. Biochem. **42**, 1567 (1964).
 - [23] K. Kanwar u. R. C. Sethi, Toxicon **9**, 179 (1971).
 - [24] R. Jaques, Helv. Physiol. Acta **13**, 113 (1955).
 - [25] J. E. Fletcher, W. B. Elliott, J. Ishay u. Ph. Rosenberg, Toxicon **17**, 591 (1979).
 - [26] A. W. Benton, J. Apicult. Res. **6**, 91 (1967).
 - [27] D. R. Hoffman, J. Allergy Clin. Immunol. **59**, 364 (1977).
 - [28] D. R. Hoffman, J. Allergy Clin. Immunol. **59**, 367 (1977).
 - [29] J. O. Schmidt u. M. S. Blum, Comp. Biochem. Physiol. **61 C**, 239 (1978).
 - [30] D. Allalouf, A. Ber u. J. Ishay, Comp. Biochem. Physiol. **43 B**, 119 (1972).
 - [31] M. Schachter u. E. M. Thain, Brit. J. Pharmacol. **9**, 352 (1954).
 - [32] A. P. Mathias u. M. Schachter, Brit. J. Pharmacol. **13**, 326 (1958).