

CHROM. 8606

TRENNUNG VON GUANIDINVERBINDUNGEN DURCH IONENAUSTAUSCHER-DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

A. VÖLKL und H. H. BERLET

Institut für Pathochemie und Allgemeine Neurochemie, Universität Heidelberg, Postfach 104340, D-69 Heidelberg (B.R.D.)*

(Eingegangen am 4. April 1975; geänderte Fassung eingegangen am 7. Juli 1975)

SUMMARY

Separation of guanidino compounds by means of ion-exchange thin-layer chromatography

Thirteen guanidino compounds including glycoyammine, glycoyamidine, creatine, creatinine, arginine and guanidinosuccinic acid were chromatographed on thin-layer plates pre-coated with ion-exchange resins. Maximum resolution was obtained on layers of the cation-exchange resin eluted with 0.12 M sodium citrate buffer of pH 5.2, permitting the separation of nine of the thirteen guanidino compounds.

Relationships between structure and physicochemical properties and the elution patterns of some selected guanidines were graphically evaluated.

EINLEITUNG

Unter den verschiedenen Gruppen von Guanidinverbindungen** können Guanidincarbonsäuren (GC) als amphotere Verbindungen angesehen werden, bei denen dem Guanidinrest basische, der Carboxylgruppe saure Eigenschaften zukommen. Eine Lactamisierung führt im einfachsten Fall zu Derivaten vom Typ des Glykocyamidins (aus Guanidinoessigsäure) bzw. des Kreatinins (aus N-Methylguanidinoessigsäure). Durch Elektrophorese oder Ionenaustauscherchromatographie lassen sich diese Iminoharnstoffabkömmlinge ähnlich wie Aminosäuren aus Gemischen solieren¹⁻⁴.

Als Teil einer systematischen Studie wird nachfolgend über die dünn-schichtchromatographische Trennung von dreizehn Guanidinen auf Ionenaustauschermatten berichtet. Unter den untersuchten Substanzen befanden sich Arginin, Kreatin, Creatinin, Glykocyamin und Guanidinobuttersäure, die für den Stoffwechsel des Warmblüterorganismus, insbesondere auch für den des Menschen, eine physiologische und pathophysiologische Rolle spielen⁵⁻⁹. Andere Derivate, wie NAB z.B., für die eine solche Bedeutung bislang nicht bekannt ist, wurden aus theoretischen Erwägungen in die vorliegende Untersuchung einbezogen.

* Direktor: Prof. Dr. G. Quadbeck.

** Für Abkürzungen der Guanidinderivate siehe Tabelle II.

TABELLE I

AUFSTELLUNG DER VERWENDETEN PUFFERSYSTEME FÜR DIE KATIONENAUSTAUSCHERCHROMATOGRAPHIE

<i>Pufferfunktion</i>	<i>Zusammensetzung der Puffer</i>	<i>pH*</i>
Äquilibrierungspuffer	14.1 g Citronensäuremonohydrat 8.0 g Natriumhydroxid 12.3 ml HCl ($d = 1.19$) ad 1000 ml Wasser bidestilliert Vor Gebrauch 1:10 mit Wasser verdünnt	3.28
Elutionspuffer	I. Citratpuffer 1. 24.6 g Citronensäuremonohydrat 14.0 g Natriumhydroxid 6.5 ml HCl ($d = 1.19$) ad 1000 ml Wasser bidestilliert	5.23
	2. Citratpuffer	4.25
	3. Citratpuffer	3.30
	4. Citratpuffer	6.00
	Zusammensetzung der Citratpuffer 2-4: siehe Merkblatt I Ionex-25 SA, PKU-Test 10.71 der Plattenhersteller-Fa.	
	II. Acetatpuffer 1-3	
	1.	3.60
	2.	4.60
	3.	5.60
	III. NaCl/HCl 1-3	
	1.	1.00
	2.	1.50
	3.	2.00
	Bestandteile der Systeme II/1-3 und III/1-3 den Geigy- Tabellen entnommen ¹⁹	

* pH-Werte der fertigen Lösungen.

MATERIAL UND METHODIK

Plattenmaterial

Für die Ionenaustauscherchromatographie wurden Fertigfolien, 20 × 20 cm, der Firma Macherey, Nagel & Co. (Minden, B.R.D.) des folgenden Typs verwendet: (a) Ionex-25 SA mit einem 5%igen Zusatz eines stark sauren Austauscherharzes in der Na-Form (Schichtdicke 0.25 mm). (b) Ionex-25 SB mit einem 5%igen Zusatz eines stark basischen Austauscherharzes in der Acetatform (Schichtdicke 0.25 mm).

Pufferlösungen

Die benutzten Puffer sind in Tabelle I zusammengestellt. Ausführliche Angaben werden nur für solche Lösungen gemacht, mit denen brauchbare Trennungen erzielt wurden.

Guanidinverbindungen

Die dreizehn untersuchten Guanidine sind zusammen mit ihren Strukturformeln und hier verwendeten Abkürzungen in Tabelle II zusammengestellt. Die Substanzen wurden mit Ausnahme von Glykocyamidin, das durch Zyklisierung von Glykocyamin gewonnen wurde²⁰, von den angegebenen Herstellern bezogen und für die

TABELLE II

ZUSAMMENSTELLUNG DER DREIZEHN UNTERSUCHTEN GUANIDINE MIT STRUKTURFORMEL, ABKÜRZUNGEN UND BEZUGSQUELLEN

Substanz	Strukturformel	Abkürzung	Bezugsquelle
β -Amidino-benzamid		NAB	Eastman-Kodak, Rochester, N.Y., U.S.A.
β -Methyl-guanidin · HCl		NMG	Schuchardt/Merck
Arginin · HCl		Arg	Merck, Darmstadt, B.R.D.
α -Amino- γ -guanidino-buttersäure · HCl · H ₂ O		AGBS	Calbiochem, Los Angeles, Calif., U.S.A.
α -Amino- β -guanidino-propionsäure · HCl		AGPS	Calbiochem
Glycocyamin		GES	Fluka, Buchs, Schweiz
Kreatin		K'	Merck
N-Amidino-asparaginsäure		NAAS	Schuchardt
Kreatinin		K''	Merck
Glycocyamidin		Gly''	Selbst hergestellt
4-Guanidino-buttersäure		GBS	Fluka

TABELLE II (Fortsetzung)

Substanz	Strukturformel	Abkürzung	Bezugsquelle
β -Guanidino-propionsäure		GPS	Calbiochem
N-Amidino-alanin		NAAL	Eastman-Kodak

Chromatographie jeweils als frisch angesetzte wässrige Lösungen (2 ml/mg Wasser bidestilliert) verwendet. Alle Guanidine waren durchwegs chromatographisch einheitlich.

Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Trennungen wurden bei Raumtemperatur und Kammersättigung in Anlehnung an die Angaben der Plattenhersteller durchgeführt: Äquilibrieren über 3 Std. mit Puffer (Tabelle I), Trocknen, Auftragen der Substanzen (2 μ l bei Einzelsubstanzen, Vielfache bei Gemischen), Trocknen nach aufsteigender Chromatographie in 0.01 N HCl und schliesslich Entwickeln im eigentlichen Elutionspuffer.

Die Anionenaustauscherplatten wurden nach dem Äquilibrieren und Auftragen der Lösungen direkt in den Elutionspuffer eingebracht. Die verschiedenen Ver-

TABELLE III

R_F -WERTE UND NACHWEISREAKTIONEN VON DREIZEHN GUANIDINVERBINDUNGEN

Die R_F -Werte beziehen sich auf die Kationenaustauscherplatten Ionex-25 SA-Na und den Citratpuffer 1/1 (Tabelle I). Das gilt auch für folgende nachstehende Angaben: Laufstrecke, 15.81 ± 1.00 cm; Fleckenlänge, 1.39 ± 0.28 cm; Fleckenbreite, 0.58 ± 0.25 cm; Nachweisgrenze, 4 μ g. Unter der Spalte Nachweisreaktionen sind die benutzten Sprühreagenzien aufgeführt: S = Sakaguchi-Reagenz²²; J = Jaffé-Reagenz²¹; N = Ninhydrin-Reagenz.

Substanz	R_F -Werte	Nachweisreaktionen		
		S	J	N
NAB	0.00	+		
NMG	0.04 ± 0.00	+		
Arg	0.06 ± 0.00	+		+
AGBS	0.09 ± 0.01	+		+
AGPS	0.09 ± 0.00	+	(bläulich weiss)	+
K''	0.10 ± 0.01	+	(gelb-grün)	+
Gly''	0.13 ± 0.00	+	(lila)	+
GBS	0.15 ± 0.01	+		
GPS	0.29 ± 0.01	+		
NAAL	0.51 ± 0.07	+		
GES	0.63 ± 0.01	+		
K'	0.65 ± 0.01	+		
NAAS	0.96 ± 0.01	+		

bindungen wurden sowohl einzeln als auch in Gemischen unterschiedlicher Zusammensetzung (im allgemeinen drei Komponenten) chromatographiert. Der Nachweis der Flecken auf dem Chromatogramm erfolgte durch Besprühen mit (a) alkalischer Pirinsäurelösung¹¹ oder (b) einem Nitroprussid-Reagenz¹².

Alle verwendeten Reagenzien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck (Darmstadt, B.R.D.).

Zusammenhang Struktur-chromatographisches Verhalten

Der Zusammenhang zwischen Struktur und chromatographischem Verhalten wurde analog zur sog. Martin-Beziehung¹³ für die Papierverteilungschromatographie nach folgender Formel geprüft¹⁴:

$$R_M = \log (1/R_F - 1)$$

ERGEBNISSE

Fig. 1 zeigt ein Chromatogramm verschiedener Guanidinigemische. Die einzelnen Flecken wurden originalgetreu nachgezeichnet. Die zugehörigen R_F -Werte sind, ansteigend, in Tabelle III zusammengestellt. Dabei wurde darauf verzichtet, "Einzel- und Gemisch- R_F -Werte" getrennt aufzuführen, da sie einander weitgehend entsprechen. Graphische Darstellung und tabellarische Angaben beziehen sich auf die

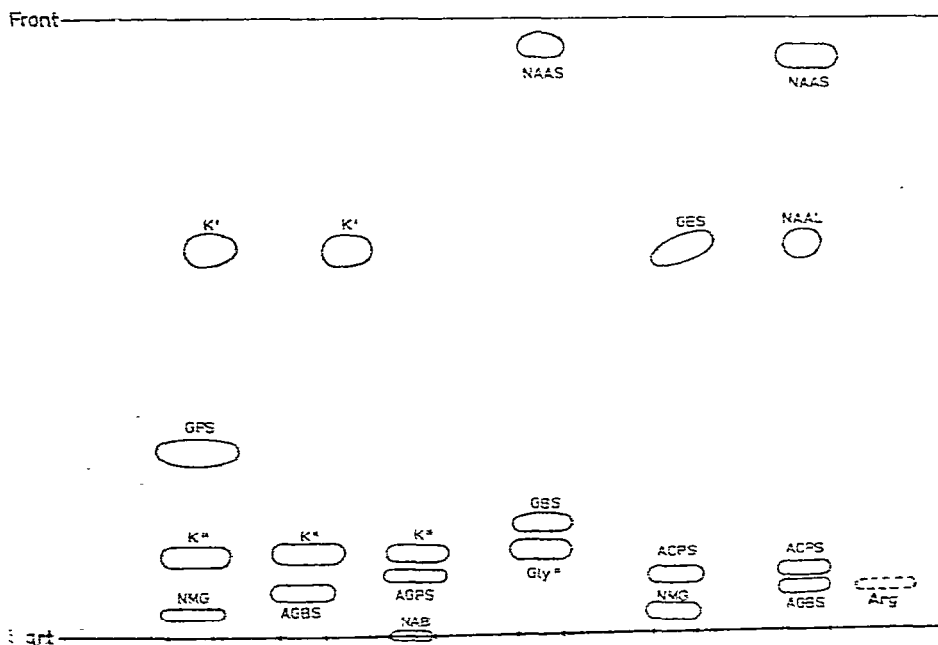


Fig. 1. Originalgetreue Skizze eines Chromatogramms, lediglich Arg eingezeichnet. Plattenmaterial: Länex-25 SA-Na; Elutionspuffer: Citratpuffer pH 5.2 (Tabelle I); Nachweisreagenz: Sakaguchi-Reagenz.

Kationenaustauscherplatten und den Citratpuffer pH 5.2. Letzterer erwies sich unter zehn Laufmittelsystemen im pH-Bereich 1.0–6.0 als der geeignetste (Trennschärfe und Anordnung der R_F -Werte).

Wie Fig. 1 zu entnehmen ist, sind NAAS, K', GES oder NAAL, GPS, GBS, K'' bzw. Gly'', AGPS, AGBS, NMG und NAB nebeneinander nachzuweisen. In den Fällen AGPS/K'' und K''/Gly'' erlaubt die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Flecken mit den Sprühreagenzien eine Differenzierung (Tabelle III, rechte Spalte). Bei K'/GES/NAAL bzw. AGBS/Arg ist eine Auftrennung mit keinem der Laufmittelsysteme aus Tabelle I zu erreichen. In den anderen Elutionsmitteln lagen entweder die R_F -Werte niedriger oder zu nahe beieinander. Entsprechendes gilt, wenn auf die 0.01 N HCl-Chromatographie verzichtet wurde. Auf den Anionenaustauscherplatten Ionex-25 SB (Acetatpuffer pH 5.0) unterschieden sich die R_F -Werte, mit Ausnahme von NAB, gleichfalls nur minimal (0.6–0.7). Von weiteren Versuchen mit anderen Puffersystemen wurde abgesehen.

Für die Verteilungschromatographie auf Cellulose fand Martin¹⁵ eine gesetzmässige Beziehung zwischen dem R_F -Wert und der Zahl homologer Bauelemente. Obwohl im vorliegenden Trennsystem mit einheitlich wässrigem Milieu eine Verteilung keine Rolle spielen sollte, veranlasste uns der homologe Bau von sechs der dreizehn Guanidine, obiges Prinzip auf seine Gültigkeit und Anwendbarkeit zu überprüfen. Für die homologen Guanidinoaminosäuren (GA) Arg, AGBS und AGPS wurde eine lineare Beziehung bei numerischem Auftragen der Zahl der CH_2 -Gruppen gegen den R_M -Wert gefunden; die Darstellung der gleichen Funktion bei den GC zeigten dagegen einen gekrümmten Verlauf. Die entsprechenden Verhältnisse bei Cellulose-DC mit Butanol–Essigsäure–Wasser als Laufmittel sind ebenfalls dargestellt.

DISKUSSION

Für die Trennung von Guanidinverbindungen erwies sich die Ionenaustauscher-DC als gut geeignet, während die Ergebnisse in der Verteilungs-DC nach eigenen Erfahrungen nicht immer befriedigend sind¹⁵. So gelang die Trennung von einigen strukturell eng verwandten Derivaten wie GBS/GPS oder Arg/AGPS nur mit Hilfe der Ionenaustauscher-DC.

Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass auch unter den günstigsten Trennbedingungen eine Auflösung von bestimmten Substanzgruppen nicht möglich war, wie die Beispiele Arg/AGBS und K'/GES/NAAL deutlich zeigen. Im ersten Fall sind hierfür wohl die geringen Basizitätsunterschiede verantwortlich zu machen, im zweiten Fall erschweren zusätzlich der grosse Fleckendurchmesser und eine wechselseitige Beeinflussung des Wanderungsvermögens im Gemisch eine Auftrennung. Die Grösse eines R_F -wertes dürfte unter den vorliegenden Bedingungen bei einem gegebenen pH-Wert in erster Linie von der strukturbedingten Acidität bzw. Basizität des jeweiligen Guanidinderivates abhängig sein. Z.B. ist vom Guanidin bekannt, dass es ähnlich basisch ist wie Alkalilaugen¹⁶, eine Folge der idealen Mesomerieverhältnisse des Kations. Die feste Bindung des NMG an das saure Austauscherharz steht damit im Einklang. Arg, AGBS und AGPS sind Homologe, die sich in der Kettenlänge um jeweils eine CH_2 -Gruppe unterscheiden. Arg ist die am stärksten basische der drei Verbindungen, sein Wanderungsvermögen vergleichsweise am geringsten. Die N-Amidinoasparaginsäure leitet sich von der Bernsteinsäure ab. Als Dicarbonsäure ist

sie unter den dreizehn Guanidinen der Tabelle II dasjenige mit der geringsten Basizität. Ihr hoher R_F -Wert unterstreicht dies.

Drückt man am Beispiel der beiden homologen Reihen Arg/AGBS/AGPS und GBS/GPS/GES den Zusammenhang zwischen Wanderungsgeschwindigkeit als R_M -Wert¹⁴ und Kettenlänge graphisch aus (s. Fig. 2 und 3), wird der Einfluss der unterschiedlichen Basizität in der Ionenaustauscher-DC besonders deutlich. Im Vergleich mit der DC auf Cellulose kommt es allerdings zu einer Umkehr der Kurvenneigung, was in der Verteilungs-DC als Ausdruck einer Adsorption der zu trennenden Substanzen aufgefasst wird. Nun bilden die wirksamen Austauschergruppen eines Harzes eine scheinbare stationäre Phase, die sich ähnlich auswirkt wie eine unspezifische Adsorption an das Trägermaterial oder die Verteilung in eine stationär-flüssigen Phase. Damit lässt sich zwischen den Einflüssen dieser beiden gleichsinnig wirksamen Faktoren —Austauschereffekt und Adsorption— in diesem Zusammenhang keine sichere Unterscheidung treffen.

Die graphische Darstellung der Funktion $R_M = f(\text{Kettenlänge})$ ergibt bei den GA eine Gerade, bei den GC eine Kurve. Drückt im Falle der GA der R_M -Wert allein den Einfluss der CH_2 -Gruppen auf das Wanderungsvermögen aus, dürfte bei den kurzkettigen, homologen GC zunächst die Wechselwirkung zwischen den beiden funktionellen Gruppen (COOH , Guanidinorest) im Vordergrund stehen. Da sich die ΔR_M -Werte mit zunehmender Kettenlänge verringern, ist anzunehmen, dass schliesslich eine Gerade resultiert, wenn der Einfluss der Carboxylgruppe geringer wird.

Von Interesse ist das Verhalten von K' im Vergleich mit GES und K'' . Die

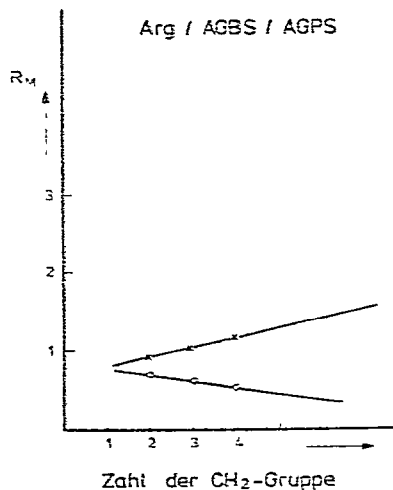


Fig. 2. Graphische Darstellung der Funktion $R_M = f(\text{Kettenlänge})$ für drei homologe GA. ○, Verteilungs-DC; *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (60:15:15); ×, Ionenaustauscher-DC; Ionex-25 SA-ölen; Citratpuffer pH 5.2.

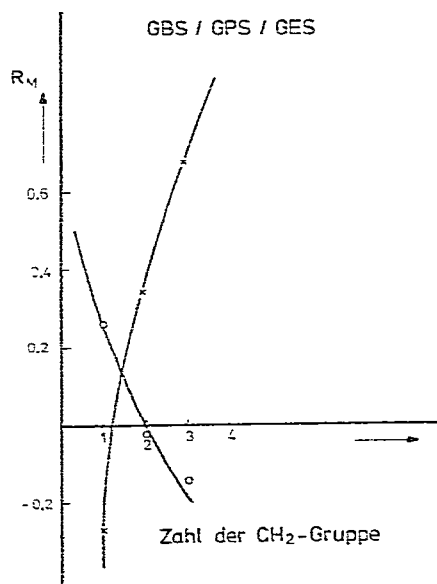


Fig. 3. Graphische Darstellung der Funktion $R_M = f(\text{Kettenlänge})$ für drei homologe GC. ○, Verteilungs-DC; *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (60:15:15); ×, Ionenaustauscher-DC; Ionex 25-SA-ölen; Citratpuffer pH 5.2.

Zyklisierung bewirkt erwartungsgemäss eine deutliche Verkürzung der Wanderungstrecke aufgrund der erhöhten Basizität des K'' . Dagegen bleibt der $+I$ -Effekt des N_1 -ständigen CH_3 -Restes ohne deutliche Wirkung auf die R_F -Werte in der Ionenaustauscher-DC. Die relativ "sauren" R_F -Werte von K' bzw. GES bei pH 5.2 entsprechen dagegen nicht den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, dass Literaturangaben zufolge¹⁷ pK'_B 14 sein soll. Sie weisen vielmehr auf eine stärkere Dissoziation der protonierten Guanidinogruppe bei pH 5.2 hin. Das würde auch mit spektralphotometrischen Ergebnissen im Einklang stehen, aus denen auf einen "wahren" pK -Wert um 5 geschlossen werden kann¹⁰.

Die Wechselwirkung zwischen Guanidiniumion und Austauschharz scheint jedoch nicht der einzige Faktor zu sein, der die Grösse des R_F -Wertes beeinflusst, wie das Beispiel NAB verdeutlicht. Von der Struktur her ist nicht erklärlich, warum NAB eine stärkere Base sein sollte als z.B. NMG. Möglicherweise spielen hier zusätzliche Adsorptionseffekte eine Rolle, worauf auch analoge Befunde bei der Ionenaustauscher-DC aliphatischer und aromatischer Amine hinweisen¹⁸.

ZUSAMMENFASSUNG

Das chromatographische Verhalten von dreizehn Guanidinverbindungen auf Dünnschichtplatte, beschichtet mit Kationen- bzw. Anionenaustauscherharz, wurde untersucht. Auf Kationenaustauscherplatten wiesen neun von dreizehn Guanidinen bei Elution mit einem 0.12 *M* Na-Citratpuffer von pH 5.2 unterschiedliche R_F -Werte auf.

Die Beziehungen zwischen Struktur und physikochemischen Eigenschaften einiger Guanidine und ihrem chromatographischen Verhalten werden beschrieben.

LITERATUR

- 1 W. S. Adams, F. W. Davis und L. E. Hansen, *Anal. Chem.*, 36 (1964) 2209.
- 2 J. Lopez-Gorge und M. Monteoliva, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 300.
- 3 S. Nateison, I. Stein und J. E. Bonas, *Clin. Chem.*, 10 (1964) 657.
- 4 Y. Robin und N. Van Thoai, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1967) 3965.
- 5 H. Döbelstein, H. H. Edel, M. Schmidt, G. Schubert und M. Weinzierl, *Klin. Wochenschr.*, 49 (1971) 348.
- 6 M. Guggenheim, in W. Ruhland (Herausgeber), *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin, 1958, S. 889.
- 7 N. Van Thoai, in G. E. W. Wolstenholme und M. P. Cameron (Herausgeber), *Comparative Biochemistry of Arginine and Derivatives*, Ciba foundation-J. A. Churchill, London, 1965, S. 3-35.
- 8 I. J. Greenblatt, *J. Biol. Chem.*, 137 (1941) 791.
- 9 M. X. Sullivan, W. C. Hess und F. Irreverre, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 633.
- 10 H. H. Berlet und A. Völkl, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 13 (1975) 53.
- 11 M. Jaffé, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 10 (1886) 391.
- 12 S. Sakaguchi, *J. Biochem. (Tokyo)*, 5 (1925) 25.
- 13 A. J. P. Martin, *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge)*, 3 (1948) 4.
- 14 J. Dvorak, I. M. Hais und A. Tockstein, in I. M. Hais und K. Macek (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, Fischer-Verlag, Jena, 2. Aufl., 1963, S. 17-89.
- 15 A. Völkl, unveröffentlicht.
- 16 A. Albert, R. Goldacre und J. Philips, *J. Chem. Soc. (London)*, (1948) 2240.
- 17 J. T. Edsall, in E. J. Cohen und J. T. Edsall (Herausgeber), *Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, Reinhold, New York, 1943, S. 116-139.
- 18 L. Lepri, P. G. Desideri und V. Coas, *J. Chromatogr.*, 79 (1973) 129.
- 19 *Wissenschaftliche Tabellen*, J. R. Geigy AG, Basel, 7. Aufl., 1968, S. 274-276.