

Zum Nachweis und zur papierchromatographischen Trennung von Guanidinverbindungen.

Von
H. Tuppy.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 30. Jan. 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 12. Febr. 1953.)

Die Farbreaktion der Guanidinverbindungen mit Diacetyl und α -Naphthol in alkalischer Lösung eignet sich für einen sehr empfindlichen Nachweis des Arginins und seiner Peptide sowie des Glykocyamins, Kreatins und anderer Guanidinosäuren nach chromatographischer Trennung auf Filtrierpapier.

Um 1. Arginin und Argininpeptide bei der Papierchromatographie partieller Eiweißhydrolysate spezifisch nachweisen zu können, 2. andere natürlich vorkommende Guanidinderivate, z. B. Glykocyamin und Kreatin, auf einfache Weise in biologischem Material aufzufinden, 3. die beim hydrolytischen Abbau guanylierter Peptide und Proteine erhältlichen α -Guanidinosäuren identifizieren zu können, bedarf es einer spezifischen Farbreaktion, mit deren Hilfe sich Guanidinverbindungen nach chromatographischer Trennung auf Filtrierpapier in sehr geringen Mengen entdecken lassen.

Die gebräuchlichen Nachweisreaktionen auf substituierte Guanidine sind in ihrer üblichen Ausführung für papierchromatographische Zwecke nicht sonderlich geeignet. Die von Roche, Felix, Robin und van Thoai¹ zur Aufindung von Arginin, Glykocyamin und einigen anderen Guanidinverbindungen natürlichen Ursprungs verwendete Sakaguchi-Reaktion² hat ernste Nachteile: Sie erfordert das Besprühen der Papierchromatogramme mit Reagenzien in wäßriger Lösung, wodurch die entstehenden Farbflecken verwaschen werden, sie ist manchen α -Guanidinosäuren gegenüber wenig empfindlich — Roche und Mourgue³ berichten, daß das Guanylderivat des Serins eine 20mal schwächere Sakaguchi-Reaktion gibt als Arginin — und

¹ J. Roche, W. Felix, Y. Robin und N. van Thoai, C. r. acad. sci., Paris 233, 1688 (1951).

² S. Sakaguchi, J. Biochem. (Tokyo) 5, 13, 133 (1925).

³ J. Roche und M. Mourgue, Bull. soc. chim. biol. 29, 896 (1947).

schließlich liegen Kreatin und die Guanylierungsprodukte aus Prolin, Oxyprolin und anderen sekundären Aminen außerhalb ihres Anwendungsbereiches. Auch in der von *Acher* und *Crocker*⁴ entscheidend verbesserten und für einen spezifischen und sehr empfindlichen Nachweis von Argininpeptiden bestimmten Form erfordert die *Sakaguchi*-Reaktion immer noch ein Besprengen mit einer wäßrigen Hypobromitlösung und erfafßt nicht jene Guanidinverbindungen, die sich von sekundären Aminen ableiten. Die von *Ames* und *Risley*⁵ angewendete *Voges-Proskauer*-Reaktion⁶ wiederum ist wegen mäßiger Empfindlichkeit unbefriedigend. 33 µg Kreatin und 200 µg Glykocyamin werden als kleinste papierchromatographisch erfafßbare Mengen angegeben⁵. Als Alternative wird die Umwandlung der Guanidinosäuren in ihre Lactame auf den Chromatogrammen durch starkes Erhitzen der Filterpapierstreifen und der anschließende Nachweis der zyklischen Verbindungen mit der *Jaffe*-Reaktion empfohlen^{5, 7}. Dieser Weg ist zur Auffindung des Kreatins in Mengen von einigen µg gangbar. Die Prozedur versagt jedoch völlig mit Glykocyamin und anderen schwer oder nicht zyklisierbaren Guanidinverbindungen.

Eigene Versuche haben nun erwiesen, daß sich die *Voges-Proskauer*-Reaktion durch zwei Änderungen, die ihre Empfindlichkeit bedeutend steigern, für papierchromatographische Verwendung adaptieren läßt: Dem alkalischen Diacetylreagens werden nach einem Vorschlag von *Barritt*⁸ sowie von *Eggleton*, *Elsden* und *Gough*⁹ geringe Mengen α -Naphthol zugesetzt und wäßrige werden durch alkoholische Lösungen ersetzt. Bei Anwendung der im Versuchsteil angegebenen Prozedur können nach Chromatographie auf Filterpapier 0,2 µg Kreatin und ebensoviel Glykocyamin noch einwandfrei entdeckt werden.

Diese äußerst empfindliche Modifikation der *Voges-Proskauer*-Reaktion ermöglicht einen einfachen und spezifischen papierchromatographischen Nachweis von Kreatin in Blut, Harn, Muskelextrakt usw. Sie stellt ferner eine ebenso empfindliche Probe auf Arginin dar wie die Ninhydrinreaktion und eignet sich infolge ihrer Spezifität bestens zur Sichtbarmachung freien und in Peptiden gebundenen Arginins in partiellen Eißweißhydrolysaten.

α -Guanidinosäuren lassen sich, wie aus den in Tabelle I zusammengestellten R_F -Werten ersichtlich wird, ebenso gut wie die α -Aminosäuren, deren Derivate sie sind, und mit den gleichen Lösungsmitteln papierchromatographisch trennen. α -Amino- und α -Guanidinosäuren sind am selben Chromatogramm auch nebeneinander nachweisbar, da eine vorhergehende Behandlung der Papierstreifen mit Ninhydrin der

⁴ *R. Acher, C. Crocker*, Biochim. Biophys. Acta **9**, 704 (1952).

⁵ *S. R. Ames und H. A. Risley*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **69**, 267 (1948).

⁶ *O. Voges und B. Proskauer*, Z. Hyg. Infekt.-Krankh. **28**, 20 (1898). — *A. Harden und D. Norris*, J. Physiol. **42**, 332 (1911).

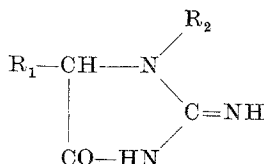
⁷ *G. A. Maw*, Biochemic. J. **43**, 139 (1948).

⁸ *M. M. Barritt*, J. Pathol. Bacteriol. **42**, 441 (1936).

⁹ *P. Eggleton, S. R. Elsden und N. Gough*, Biochemic. J. **37**, 526 (1943).

Tabelle 1. R_F -Werte von α -Guanidinosäuren.

	Phenol/ Wasser (0,3% NH ₃)	n-Butanol/ Wasser	n-Butanol/ Eisessig/ Wasser (4:1:5)	n-Butanol/ Pyridin/ Wasser (3:2:3)
Guanyl-glycin (Glykocyamin)	0,71	0,06	0,27	0,27
„ sarkosin (Kreatin)	0,86	0,06	0,30	0,26
„ alanin (Alakreatin)	0,78	0,12	0,40	0,35
„ valin	0,86	0,31	0,65	0,50
„ leucin	0,95	0,45	0,72	0,58
„ isoleucin	0,93	0,45	0,74	0,58
„ serin	0,56	0,05	0,22	0,30
„ threonin	0,70	0,11	0,34	0,32
„ cystin	0,62	0,01	0,15	0,19
„ methionin	0,90	0,30	0,59	0,52
„ prolin	0,92	0,10	0,37	0,35
„ oxyprolin	0,70	0,05	0,20	0,26
„ phenylalanin	0,97	0,45	0,72	0,61
„ tyrosin	0,83	0,26	0,57	0,56
„ tryptophan	0,84	0,36	0,64	0,60
„ asparaginsäure	0,29	0,01	0,27	0,18
„ glutaminsäure	0,34	0,01	0,35	0,18

Tabelle 2. Papierchromatographie der Lactame von α -Guanidinosäuren.

R_1	R_2		R_F -Wert in n-Butanol/ Wasser
H	H	Glykocyamidin	0,18
H	CH ₃	Kreatinin	0,21
H	C ₂ H ₅	1-Äthyl-glykocyamidin	0,38
CH ₃	H	Alakreatinin	0,33
CH ₃ · S · CH ₂	H	Lactam des Guanyl-methionins	0,57
(CH ₃) ₂ CH	H	„ „ „ valins	0,60
(C ₂ H ₅) (CH ₃)CH	H	„ „ „ isoleucins	0,73
C ₆ H ₅ · CH ₂	H	„ „ „ phenylalanins	0,70
HO · C ₆ H ₄ · CH ₂	H	„ „ „ tyrosins	0,55

äußerst empfindlichen Diacetyl- α -Naphthol-Reaktion nicht abträglich ist. Alle in der Tabelle 1 angeführten Guanidinosäuren lassen sich mit der modifizierten *Voges-Proskauer*-Reaktion in einer Menge von 1 μ g oder weniger auffinden.

Kreatinin, Glykocyamidin und andere durch Säure- und Hitzebehandlung aus α -Guanidinosäuren unter Ringschluß entstehenden Lactame, Derivate des Hydantoin-imids-(2), welche ebenfalls mit Erfolg der Papierchromatographie unterworfen werden können (Tabelle 2), entwickeln mit dem beschriebenen Reagens keine Färbung. Wohl aber sind sie mit Hilfe der Reaktionen von *Jaffe*¹⁰ und von *Benedict* und *Behre*¹¹, welche von uns für papierchromatographischen Gebrauch ebenfalls modifiziert wurden, gut nachweisbar. Bei Einhaltung der unten angegebenen Vorschriften geben mit alkalischer Pikrinsäure noch 0,5 μ g Kreatinin und 1 μ g Glykocyamidin, mit alkalischer 3,5-Dinitrobenzoesäure noch 0,5 μ g Kreatinin und 2 μ g Glykocyamidin deutliche Farbflecken. Gegenüber früheren papierchromatographischen Anwendungen der *Jaffe*-Reaktion^{5, 7, 12} bedeutet das eine beträchtliche Steigerung der Empfindlichkeit. Die modifizierte Reaktion eignet sich ausgezeichnet zum papierchromatographischen Nachweis des Kreatinins im Harn. Man benötigt hierzu nicht mehr als 1 μ l Urin.

Die Empfindlichkeit der *Jaffe*-Reaktion nimmt jedoch sehr stark ab, wenn man von Glykocyamidin und Kreatinin zu jenen Hydantoin-imidderivaten übergeht, die sich von Alanin, Methionin, Valin, Isoleucin usw. herleiten. Von Alakreatinin lassen sich nur mehr 5 μ g, von den Abkömmlingen des Valins und Isoleucins bestenfalls 10 bis 20 μ g nachweisen. Hier bewährt sich jedoch die Möglichkeit eines hydrolytischen Aufsprengens des Hydantoinringes. Erhitzt man die Lactame mit 0,3%igem Ammoniak im Einschlußrohr einige Stunden lang auf 105°, so bilden sie zu einem großen Teil wieder α -Guanidinosäuren zurück, welche sich, wie beschrieben, mit Hilfe der Diacetyl- α -Naphthol-Reaktion in äußerst geringen Mengen papierchromatographisch identifizieren lassen.

Experimenteller Teil.

Darstellung der α -Guanidinosäuren.

Glykocyamin und Kreatin wurden nach *Schütte*¹³ durch Behandlung von Glycin bzw. Sarkosin in ammoniakal. Lösung mit S-Methylisothioharnstoffsulfat erhalten, die Guanylderivate des DL-Alanins, DL-Phenylalanins, DL-Serins, DL-Threonins, L-Cystins, DL-Methionins und der DL-

¹⁰ *M. Jaffe*, Z. physiol. Chem. **10**, 391 (1886).

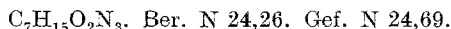
¹¹ *S. R. Benedict* und *J. A. Behre*, J. Biol. Chem. **114**, 515 (1936). — *W. D. Langley* und *M. Evans*, ibid. **115**, 333 (1936).

¹² *C. E. Dent*, Biochemie. J. **41**, 240 (1947).

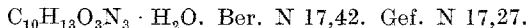
¹³ *E. Schütte*, Z. physiol. Chem. **279**, 52 (1943).

Asparaginsäure auf dem gleichen Wege nach den Angaben von *M. Mourgue*¹⁴. Analog ließen sich auch die bereits auf andere Weise gewonnenen Derivate des DL-Valins¹⁵, DL-Leucins¹⁶, DL-Prolins¹⁷ und L-Tryptophans¹⁷ darstellen. DL-Oxyprolin wurde nach *Kapfhammer* und *Müller*¹⁷ mit Cyanamid guanyliert. Guanyl-DL-isoleucin ist bisher noch nicht dargestellt worden. Für die Gewinnung des Guanyl-L-tyrosins¹⁴ beschreiben wir einen neuen Weg.

Guanyl-DL-isoleucin. 0,66 g DL-Isoleucin wurden, in 10 ccm konz. Ammoniak gelöst, bei Zimmertemp. mit 0,70 g S-Methyl-isothioharnstoff-sulfat ungesetzt. Über Nacht schied sich die Guanidinverbindung in Form von¹⁸ Kristallnadeln ab. Diese wurden nach 2tägigem Stehen abgesaugt (0,29 g), aus Wasser-Äthanol umkristallisiert und bei 100° im Vak. getrocknet.



Guanyl-L-tyrosin. 100 mg 5-[p-Oxybenzyl]-glykocyamidin¹⁸ wurden mit 5 ccm 1/2%igem Ammoniak 18 Stdn. lang im Einschlußrohr auf 105° erhitzt. Die aus der gelbgefärbten Reaktionsflüssigkeit beim Erkalten abgeschiedenen nadelförmigen Kristalle, 35 mg, unverändertes Ausgangsmaterial, wurden abgesaugt und das Filtrat eingedampft. Das zurückbleibende Öl verwandelte sich bei Behandlung mit Aceton in ein weißes Pulver. Dieses wurde aus wenig Wasser unter Verwendung von Tierkohle umkristallisiert, mit möglichst wenig Wasser, dann mit Alkohol gewaschen und bei Zimmertemp. im Vak. über Phosphorpentoxyd getrocknet. Schmp. 204 bis 205°. *Jaffe*-Reaktion negativ, *Diacetyl- α -Naphthol*-Reaktion positiv.



Darstellung der Lactame der α -Guanidinosäuren.

Glykocyamidin, Kreatinin und Alakreatinin (5-Methyl-glykocyamidin) wurden nach den Angaben von *H. King*¹⁹ gewonnen. Die aus DL-Valin, DL-Isoleucin, DL-Phenylalanin und DL-Methionin dargestellten α -Guanidinosäuren wurden durch Erhitzen mit Salzsäure in ihre Lactame übergeführt; das Lactam des Guanyl-DL-valins war bereits auf anderem Wege¹⁵ erhalten worden, die drei anderen werden erstmals beschrieben. Das 5-[p-Oxybenzyl]-glykocyamidin¹⁸ und das 1-Äthyl-glykocyamidin wurden aus den Estern des L-Tyrosins bzw. N-Äthylglycins durch Umsetzung mit Guanidin dargestellt; das Äthylglykocyamidin war bereits 1886 von *Duwillier* in schlechter Ausbeute aus Äthylglycin und Cyanamid erhalten worden²⁰.

5-Isopropyl-glykocyamidin. 0,30 g Guanyl-DL-valin wurden mit konz. Salzsäure 2mal auf dem Wasserbad zur Trockene verdampft. Der Rückstand, der beim Stehen in der Kälte kristallisierte, wurde in möglichst wenig Wasser gelöst. Wurde nun durch Zusatz von Ammoniak schwach alkalisch gemacht, kristallisierte das Lactam augenblicklich aus. Es bildete nach Umkristallisieren aus Wasser kristallwasserhaltige Nadeln (0,21 g). Die durch Trocknen

¹⁴ *M. Mourgue*, Bull. soc. chim. France 1948, 181.

¹⁵ *H. Ramsay*, Ber. dtsh. chem. Ges. 41, 4389 (1908). — *M. E. Duwillier*, C. r. acad. sci., Paris 91, 172 (1880).

¹⁶ *E. Duwillier*, C. r. acad. sci., Paris 104, 1290 (1887).

¹⁷ *J. Kapfhammer* und *H. Müller*, Z. physiol. Chem. 225, 1 (1934).

¹⁸ *E. Abderhalden* und *H. Sichel*, Z. physiol. Chem. 175, 68 (1928).

¹⁹ *H. King*, J. Chem. Soc. London 1930, 2374.

²⁰ *E. Duwillier*, C. r. acad. sci., Paris 103, 212 (1886).

bei 150° entwässerte Verbindung zersetzt sich ab 240° und ist bei 260° klar durchgeschmolzen.

5-sec. Butyl-glykokocamidin wurde analog aus Guanyl-DL-isoleucin erhalten, aus Wasser umkristallisiert und bei 150° getrocknet. Schmp. unscharf: 225 bis 237°.

$C_7H_{13}ON_3$. Ber. N 27,08. Gef. N 27,50.

5-Benzyl-glykokocamidin. 178 mg Guanyl-DL-phenylalanin wurden mit 1,8 ccm konz. Salzsäure in einem Glasrohr eingeschmolzen 5 Stdn. lang auf 105° erhitzt. Der nach Abdampfen der Salzsäure kristallisierende Rückstand wurde in wenig warmem Wasser gelöst. Bei Zusatz von 2 Tropfen konz. Ammoniak schied sich das Lactam sofort in Form rein weißer Kristalle aus (151 mg). Zur Analyse wurde es 2mal aus siedendem Wasser umkristallisiert und mehrere Stunden lang bei 100° getrocknet. Es zersetzt sich ab 240° und ist bei etwa 260° völlig geschmolzen.

$C_{10}H_{11}ON_3$. Ber. N 22,21. Gef. N 22,24.

5-Methylthiomethyl-glykokocamidin. 130 mg Guanyl-DL-methionin wurden mit 1,5 ccm konz. Salzsäure 7 Stdn. lang im Einschlußrohr auf 105° erhitzt. Nach Abdampfen der Salzsäure wurde der sirupöse Rückstand in einigen Tropfen Wasser gelöst und mit konz. Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion versetzt. Bei Reiben der Gefäßwand trat Kristallisation ein. Das Lactam (63 mg) wurde 3mal aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert und 6 Stdn. lang bei 100° getrocknet. Schmp. 176 bis 183°.

$C_6H_{11}ON_3S$. Ber. N 24,26. Gef. N 24,18.

1-Äthyl-glykokocamidin. 2,5 g Guanidinhydrochlorid wurden in warmem absol. Äthanol gelöst und mit einer aus 0,60 g Na bereiteten alkohol. Natrium-äthylatlösung vermischt. Nach Absaugen des ausfallenden Natriumchlorids wurden in das Filtrat 1,15 g N-Äthylglycin-äthylester eingetragen. Die stark nach Ammoniak riechende Flüssigkeit wurde auf dem Wasserbad so weit als möglich von Alkohol befreit, der Rückstand noch $\frac{1}{2}$ Std. lang auf zirka 70° erhitzt und dann abgekühlt. Bei Zusatz von wenig absol. Alkohol begann 1-Äthyl-glykokocamidin auszukristallisieren; die Hauptmenge schied sich ab, als Eisessig bis zur neutralen Reaktion zugetropft wurde. Das weiße Reaktionsprodukt (1,01 g) wurde aus 1,5 ccm heißem Wasser umkristallisiert und bei 100° im Vak. getrocknet. Über 250° erhitzt, zersetzt sich das Äthyl-glykokocamidin unter Dunkelfärbung, ist jedoch erst bei zirka 275° völlig geschmolzen.

Alle Schmelzpunkte wurden im *Kofler*-Mikroschmelzpunktsapparat bestimmt.

Diacetyl- α -Naphthol-Reaktion auf Guanidinverbindungen.

Man bereitet sich folgende zwei Reagenslösungen: *Lösung I*: In 30 ccm 95%igen Alkohol werden 1 g metallisches Natrium und 0,3 g α -Naphthol eingetragen. *Lösung II*: 0,1% Diacetyl in 95%igem Äthanol. Beide Lösungen sind, im Eisschrank aufbewahrt, mehrere Tage lang haltbar.

Zum Nachweis von Guanidinverbindungen auf Papierchromatogrammen werden diese zuerst mit Lösung I und hierauf, nach Trocknen bei Zimmertemp., mit Lösung II besprüht. Die Farbentwicklung setzt während des anschließenden neuerlichen Trocknens ein und erreicht nach 10 bis 20 Min. maximale Stärke. Die Farbe ist mehrere Stunden lang beständig. Die

Guanylderivate der α -Aminosäuren und Arginin geben rotviolette Flecken auf farblosem Grund. Die mit Kreatin sowie mit den Guanylderivaten des Prolins und Oxyprolins erhaltene Färbung hat einen Stich ins Blaue. Nach längerem Aufbewahren verblassen die Farbflecken und zugleich tritt Verfärbung des anfangs farblosen Untergrundes auf.

Ersetzt man die 0,1%ige alkohol. Diacetylösung durch eine entsprechende Acetylbenzoyllösung²¹, so erhält man mit den von uns untersuchten Guanidinverbindungen veilchenblaue Farbtöne; die Guanylderivate des Serins, Threonins und Cystins färben sich vorübergehend gelb und erst allmählich, braune Zwischentöne durchlaufend, blau. Bei Verwendung von Acetylbenzoyl an Stelle von Diacetyl ist der Nachweis der Guanidinverbindungen etwas weniger und im Falle von Guanylprolin und -oxyprolin sowie von Kreatin sogar bedeutend weniger empfindlich.

Auch ein Ersatz des α -Naphthols durch β -Naphthol oder 8-Oxychinolin hat eine merkbare Verminderung der Empfindlichkeit der Farbreaktionen zur Folge.

Modifizierte *Jaffe*-Reaktion.

Die Papierchromatogramme werden zunächst mit einer 1%igen Lösung von Pikrinsäure in 95%igem Äthanol und sodann, nach Trocknen, mit einer 5%igen alkohol. Kalilauge besprüht. Die Farbentwicklung setzt nach einigen Minuten ein. Kreatinin, Glykocyamidin und die Lactame anderer α -Guanidinsäuren geben eine ziegelrote Färbung auf gelbem Grund. Diese ist tagelang haltbar.

Verwendet man statt der alkohol. Pikrinsäurelösung die von *Benedict* und *Behre*¹¹ eingeführte 3,5-Dinitrobenzoesäure, ebenfalls in 1%iger alkohol. Lösung, so erhält man mit Glykocyamidin und Kreatinin blauviolette Flecken auf farblosem Grund.

Papierchromatographie.

Das verwendete Filtrierpapier war Schleicher & Schüll 2043 b. Die Lösungsmittel durchströmten das Papier in absteigender Richtung. Zur Bestimmung der R_F -Werte sowie der Empfindlichkeit der Farbreaktionen wurden stets 2,5 μ l einer wäßr. Lösung der untersuchten Substanz mit Hilfe einer Konstriktionspipette auf das Filtrierpapier gebracht. Die kleinste Menge einer Verbindung, welche nach etwa 15stünd. Chromatographie mit wassergesättigtem n-Butanol als Lösungsmittel auf dem Chromatogramm einen eben noch deutlich sichtbaren Farbfleck lieferte, wurde als minimale nachweisbare Substanzmenge bezeichnet.

Die Stickstoffanalysen wurden von Dr. *G. Kainz* im Mikroanalytischen Laboratorium des II. Chemischen Institutes ausgeführt.

Der Autor dankt der Österreichischen Akademie der Wissenschaften für die ihm aus den Mitteln der *Seegen*-Stiftung gewährte Unterstützung.

²¹ *K. Lang*, Z. physiol. Chem. **208**, 273 (1932).