

# Biochemische Studien über den Guanidinkörper. II. Weitere Studien über eine Reaktion zwischen Ammoniak und Amino-verbbindung in Gegenwart von Kohle.

Von Shinichi SHIBUYA.

(Eingegangen am 1. Juni 1944.)

Aus den bisherigen Untersuchungen über die Kreatinbildung im Tierkörper hat der Bildungsmechanismus die Neigung gezeigt, dass Kreatin, eine methylierte Guanidoverbindung, aus Glycin über Glykozyamin entsteht; folglich dürfte es nicht unmöglich sein, dass auch andere natürlich vorkommende Guanidoverbindungen aus den ihnen zugrunde liegenden Aminoverbindungen synthetisiert werden. In der vorherigen Arbeit hat der Verfasser (1942) beobachtet, dass sich nur die  $\omega$ -Aminosäure wie Glycin durch Ammoniak unter katalytischer Wirkung der Kohle guanylieren lässt. Aus dieser Tatsache scheint hervorzugehen, dass die  $\omega$ -Aminogruppe für die Guanylierung wesentlich ist. Daher wurde in dieser Arbeit eine Reihe von Versuchen mit unten beschriebenen Bedingungen ausgeführt, um zu bestätigen ob dies auch bei anderen Aminoverbindungen der Fall ist oder nicht. Die Bedingungen waren folgende: Abgesehen von besonderen Fällen war die Reaktionszeit stets 24 Stunden, die Menge der Probesubstanzen 1 m. Mol und das pH des Reaktionsmediums etwas grösser als 9.8. Übrigens diente die in der ersten Mitteilung berichtete Bedingung dazu, ein Gemisch von ammoniakalischer Lösung der Probesubstanz und Kohle oder Cyanamid anstatt der Kohle bei 37° stehen zu lassen. Hierbei wurde auch der Einfluss von einigen Substanzen auf die Guanylierung des Glycins in der Phosphatpufferlösung (30 ccm) ohne Zusatz von freiem Ammoniak untersucht. Da allerdings zur Elution des gebildeten Guanidinkörpers 60%iger Äthanol in allen Fällen nicht anwendbar war, verwandte man in diesen Versuchen die geeigneten Elutionsmethoden, deren Einzelheiten in den betreffenden Stellen ausführlich beschrieben werden. Der Guanidinkörper im Eluat wurde kolorimetrisch nach der gleichen Methode wie die in der vorigen Arbeit bestimmt.

## Experimenteller Teil.

### I. Materialien.

1. Kohle (Merck, gepulvert, für medizinische Zwecke).
2. Ammoniak (10%, Japanisches pharmazeutisches Präparat).
3. Methylaminhydrochlorid (Kahlbaum).
4. Äthylaminhydrochlorid: Aus Acetamid nach M. Guerbet (1899).
5. n-Propylaminhydrochlorid (Kahlbaum).
6. Isobutylamin (Schuchardt).
7. n-Amylaminhydrochlorid: Es wurde nach P. Mendius (1862) von Dr. Y. Muto in hiesigem Institut hergestellt.

8. Äthyldiaminhydrat: Aus Äthylenbromid nach P. Rhoussopoulos und F. Meyer (1882).
9. Glycin (Takeda).
10.  $\alpha$ -Alanin (Takeda).
11.  $\beta$ -Alanin (Schuchardt).
12. Phenylalanin (Takeda).
13. Taurin (Takeda).
14. Ornithindihydrochlorid: Aus Arginin nach M. Bergmann und L. Zervas (1926).
15. Lysindihydrochlorid. (Takeda).
16.  $\epsilon$ -Aminocapronsäure: Es wurde nach O. Wallach (1900) von Dr. Y. Muto in hiesigem Institut dargestellt.
17. Tryptophan (Takeda).
18. Hydantoinsäure: Aus Glycin nach R. Andreasch (1902).
19. Asparagin (Kahlbaum).
20. Glycylglycin (Fränkel & Landau).
21. Natriumcyanamid (Schuchardt).
22. Acetamid: Aus Ammoniumacetat nach W. A. Noyes und W. F. Goebel (1922).
23. Ammoniumcarbamid (Fränkel & Landau).
24. Ammoniumsulfat (Kahlbaum).
25. Kaliumcyanat: Aus Ferrocyanikalium nach H. Erdmann (1893).
26. Harnstoff (Kahlbaum).

## II. Ergebnisse.

### (1) Bildung des Guanidinkörpers aus Amin.

Da der gebildete Guanidinkörper im Verlaufe von Versuchen an Kohle adsorbiert worden ist, wird vor seiner Elution zur Beseitigung des mitanhaltenden Amins die Kohle erst mit Wasser, dann 90%igem Äthanol so gut wie möglich ausgewaschen, weil sich solcher an Kohle adsorbierte Guanidinkörper nach der Probéuntersuchung mit Methylguanidin durch die Behandlung mit obigen Waschmitteln nicht befreien lässt. Nach dem Auswaschen wird der Guanidinkörper mit Essigsäure-Äthanollösung (Zusammensetzung: 5 ccm 30% Essigsäure+10 ccm Wasser+15 ccm 90% Äthanol) von der Kohle eluiert und dann bestimmt. Wenigstens bei der Probebestimmung von Methylguanidin an sich kann man mittels dieser Technik ganz guten Erfolg erhalten.

Aus Tabelle I ergibt sich, dass in dieser Bedingung die Glykocyaminäquivalenz des gebildeten Guanidinkörpers aus Methylamin weit grösser ist als die aus anderen Aminen. Obwohl diese Ursache unklar ist, konnte man feststellen, dass die endständige Aminogruppe an der Kette immerhin guanyliert wird.

### (2) Bildung des Guanidinkörpers aus Aminosäure.

Auf Grund der Tatsache, dass die an Kohle adsorbierte Guanidosäure wie Glykocyamin oder Arginin mit der Essigsäure-Äthanollösung völlig eluiert werden kann, liessen sich die Guanidinkörper aus verschiedenen Aminosäuren hauptsächlich mit diesem Elutionsmittel befreien. Aber ausser besonderem Falle vor der Elution wurde die Kohle nicht mit

Äthanollösung ausgewaschen. Infolge von Bestimmung war die Glykocyanäquivalenz des Guanidinkörpers aus  $\beta$ -Alanin viel grösser als die aus Glycin, dagegen fiel die aus  $\alpha$ -Alanin fast negativ in gleicher Bedingung aus.

Tabelle 1. Bildung des Guanidinkörpers aus Amin.

| Probesubstanz     | Wasch- und Elutionsmethode | Glykocyanäquivalenz (mg) |
|-------------------|----------------------------|--------------------------|
| Methylamin-HCl    | 9A.-E.A.                   | 0.0439                   |
| Äthylamin-HCl     | "                          | 0.0046                   |
| n-Propylamin-HCl  | "                          | 0.0030                   |
| Isobutylamin      | "                          | 0.0028                   |
| n-Amylamin-HCl    | "                          | 0.0025                   |
| Äthyldiaminhydrat | "                          | 0.0040                   |

Das Symbol 9A.-E.A. bedeutet, dass der Guanidinkörper mit der Essigsäure-Äthanollösung von der Kohle eluiert wird, die vorher erst mit Wasser, dann 90% igem Äthanol ausgewaschen worden ist.

Tabelle 2. Bildung des Guanidinkörpers aus Aminosäure.

| Probesubstanz                | Wasch- und Elutionsmethode | Glykocyanäquivalenz (mg)                                 |
|------------------------------|----------------------------|--|
| Glycin                       | E.A.                       | 0.0094   |
| $\alpha$ -Alanin             | "                          | Spur   |
| $\beta$ -Alanin              | "                          | 0.0290   |
| Phenylalanin                 | "                          | 0  |
| Taurin                       | 6A.                        | 0.0046   |
| Taurin                       | E.A.                       | 0.0055   |
| Ornithin-2HCl (0.5 m.M.)     | "                          | (Entstehung von violettrötem Farbstoff) <sup>(1)</sup>   |
| Ornithin-2HCl (0.5 m.M.)     | 2(6A.-E.A.)                | 0.0032   |
| Lysin-2HCl (0.5 m.M.)        | E.A.                       | (Entstehung von orangem Farbstoff) <sup>(2)</sup>        |
| Lysin-2HCl (0.5 m.M.)        | 2(6A.-E.A.)                | unklar   |
| $\epsilon$ -Aminocapronsäure | E.A.                       | unklar   |
| $\epsilon$ -Aminocapronsäure | 9A.-E.A.                   | 0  |
| Tryptophan (0.5 m.M.)        | E.A.                       | (Entstehung von schwarzbraunem Farbstoff) <sup>(3)</sup> |

(1), (2) Diese Farbstoffe entstehen aus dem entsprechenden Eluate bei zeitweiligem Stehenbleiben unter Zimmertemperatur in der Luft.

(3) Dieser Farbstoff entsteht aus dem Eluat beim Abdampfen auf dem siedenden Wasserbade.

Das Symbol E.A. drückt aus, dass der Guanidinkörper mit der Essigsäure-Äthanollösung von der Kohle eluiert wird, die vorher nur mit Wasser ausgewaschen worden ist.

Das Symbol 6A. zeigt, dass anstatt der Essigsäure-Äthanollösung als Elutionsmittel in E.A. 60% igem Äthanol gebraucht wird.

Das Symbol 2 (6A.-E.A.) bedeutet, dass der 90% igem Äthanol als Waschmittel in 9A.-E.A. durch 60% igem Äthanol ersetzt, dann der aus dem Eluat nach dem Abdampfen erhaltene Rückstand wieder in ammoniakalischem Wasser gelöst und noch einmal die Adsorption an Kohle, Waschung, und Elution nacheinander ausgeführt wird.

Da die Entstehung von Farbstoffen aus Ornithin, Lysin, und Tryptophan interessant ist, wünscht der Verfasser darüber in Zukunft weitere Untersuchungen durchzuführen. Aber diese Tatsache hindert die Kolorimetrie von Guanidinkörper aus den obigen Aminosäuren. Daher wurde vor der Bestimmung des Guanidinkörpers aus Ornithin oder Lysin das unten beschriebene Verfahren eingeführt. Nach dem Abfiltrieren vom Reaktionsgemisch wird der Rückstand zuerst mit Wasser, dann 60%igem Äthanol ausgewaschen und zuletzt mit der Essigsäure-Äthanollösung als Elutionsmittel behandelt. Das so erhaltene und Farbstoff enthaltene Eluat (siehe die Fussnote von Tabelle 2) dampft man bis zur Eintrocknung auf dem siedenden Wasserbade ab. Da aber die beiden Farbstoffe aus Ornithin und Lysin mit dieser Behandlung gleich zur bräunlichen verfärbten, könnten diese eventuell zerstört werden. Zu dem in 30 ccm Wasser gelösten Rückstand werden 1 ccm 10%iges Ammoniak und 1 g Kohle hinzugefügt. Nach der Schüttelung (5 Minuten bei Zimmertemperatur) dieses Gemisches wird es abfiltriert, um nachfolgend nochmalige Waschung und Elution auszuführen. Infolge der Bestimmung konnte man die Bildung des Guanidinkörpers aus Ornithin erkennen, aber die aus Lysin nicht. Diese Ursache beruht darauf, dass trotz der obenerwähnten Behandlung sich das wieder gewonnene Eluat aus dem letzteren beim Abdampfen noch bräunlich schmutzig färbte und diese Färbung die Farbenreaktion von Sakaguchi unmöglich machte. Aber man muss beachten, dass auch die Reaktion von Guanidinkörper aus  $\epsilon$ -Aminocapronsäure negativ ausfiel. Da jedoch die eine lange Kette habende Aminosäure wie  $\epsilon$ -Aminocapronsäure ziemlich stark an Kohle adsorbiert wird, findet sich die Möglichkeit, dass solche Aminosäure mit daraus gebildetem Guanidinkörper bei der Elution in das Eluat übergehen könnte. Deshalb mag bei von leicht adsorbierbarer Aminoverbindung herstammendem Guanidinkörper diese Möglichkeit die Ursache des negativen Ausfalls von Sakaguchi probe sein (C. J. Weber, 1930), obwohl aus solcher Aminoverbindung die Bildung des Guanidinkörpers nicht unmöglich sein dürfte.

### (3) *Bildung des Guanidinkörpers aus anderer Aminoverbindung.*

Wie aus Tabelle 3 ersichtlich ist, bildet sich kein Guanidinkörper aus Hydantoinäsäure, ungeachtet die Säure als ein Zwischenprodukt, wie Citrullin aus Ornithin (Krebs und Henseleit, 1932), bei der Guanylierung des Glycins vermutet wird, wenn man voraussetzt, dass sich im Organismus Glycocyamin durch Einwirkung von  $\text{NH}_3$  und  $\text{CO}_2$  auf Glycin darstellt. Ausserdem übt diese Säure keinen Einfluss auf die Guanylierung des Glycins aus. Daraus folgt, dass unter dieser Bedingung die Hydantoinäsäure nicht als ein Zwischenprodukt beim Übergang von Glycin in Glycocyamin betrachtet werden kann. Dieses Resultat stimmt mit dem von S. Schoenheimer u. a. (1940) im Organismus beobachteten überein. Ferner ergibt Asparagin keinen mit der Essigsäure-Äthanollösung zu eluierenden Guanidinkörper. Interessant ist, dass ein roter Farbstoff beim Abdampfen von aus Glycylglycin gewonnenem Eluat entstand. Aber aus dieser Tatsache liess sich der Guanidinkörper aus Glycylglycin nicht bestimmen.

Tabelle 3. Bildung des Guanidinkörpers aus anderer Aminoverbindung, insbesondere aus Hydantoinsäure.

| Probesubstanz           | Wasch- und Elutionsmethode | Glykocystaminäquivalenz (mg)      |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Hydantoinsäure          | E.A.                       | 0                                 |
| Glycin + Hydantoinsäure | „                          | 0.0095                            |
| Glycin                  | „                          | 0.0094                            |
| Asparagin               | „                          | 0                                 |
| Glycylglycin            | „                          | (Entstehung von rotem Farbstoff)* |
| Glycylglycin            | 6A.-E.A.                   | 0                                 |
| Glycylglycin            | 9A.-E.A.                   | unklar                            |

\* Dieser Farbstoff entsteht aus dem Eluat beim Abdampfen auf dem siedenden Wasserbade.

Das Symbol 6A.-E.A. zeigt, dass der 90%ige Äthanol als Waschmittel in 9A.-E.A. durch 60%igen Äthanol ersetzt wird.

(4) *Vergleichung zwischen zweierlei Guanylierungen durch Cyanamid und Kohle.*

Ganz analog wie bei Kohle wird Hydantoinsäure durch Cyanamid auch nicht guanyliert. In der ersten Mitteilung hat der Verfasser berichtet, dass die Guanylierung des Glycins durch Kohle keineswegs auf

Tabelle 4. Vergleichung zwischen zweierlei Guanylierungen durch Cyanamid und Kohle.

| Probesubstanz  | Cyanamid                   |                              | Kohle                      |                              |
|----------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                | Wasch- und Elutionsmethode | Glykocystaminäquivalenz (mg) | Wasch- und Elutionsmethode | Glykocystaminäquivalenz (mg) |
| Acetamid       | E.A.                       | 0                            | —                          | —                            |
| Hydantoinsäure | „                          | 0                            | E.A.                       | 0                            |
| Glycylglycin   | „                          | 0.0029                       | 9A.-E.A.                   | unklar                       |
| Taurin         | 6A.                        | 0.0247                       | 6A.                        | 0.0046                       |

Bei Versuche durch Cyanamid wurde 1 ccm 0.024%ige Cyanamidlösung gebraucht.

Cyanamid beruht, welches in der Kohle vorher als unreiner Bestandteil enthalten ist. Aber Tabelle 4 zeigt, dass sich eine Ähnlichkeit zwischen zweierlei Guanylierungen durch Cyanamid und Kohle findet. Daher kann man die Möglichkeit nicht verneinen, dass die Aminoverbindung durch im Verlaufe von Versuche unter Wirkung von Kohle je kleine Menge neu zu bildendes Cyanamid langsam guanyliert wird.

(5) *Einfluss von einigen Substanzen auf die Guanylierung des Glycins durch Kohle in Phosphatpufferlösung.*

Eine Reihe von Versuchen wurde in 30 ccm 0.1 M. Phosphatpufferlösung (pH 7.4) unter in Tabelle 5 beschriebenen Bedingungen ohne Zusatz von freiem Ammoniak ausgeführt.

Wie in Tabelle 5 gezeigt ist, wird Glycin einerseits beim Stehenlassen vom Reaktionsgemisch ohne Zusatz von freiem Ammoniak guanyliert, andererseits geben Ammoniumcarbamid (geht in Wasser in Ammoniumcarbonat über), Kaliumcyanat, Kaliumcyanat + Ammoniumsulfat (sie sind

reversibel in Ammoniumcyanat überzuführen), und Harnstoff in diesen Bedingungen keinen Einfluss auf die Guanylierung des Glycins, während nur Ammoniumsulfat diese Reaktion beschleunigt, so dass die Glyko-

Tabelle 5. Einfluss von einigen Substanzen auf die Guanylierung des Glycins durch Kohle in Phosphatpufferlösung.

| Probesubstanz                                    | Reaktionszeit<br>(in St.) | pH von<br>Filtrat | Wasch- und<br>Elutions-<br>methode | Glykocyanin-<br>äquiv.<br>(mg) |
|--|---------------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------------------|
| Glycin   | 21                        | 7.3               | E.A.                               | Spur                           |
| Glycin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$            | "                         | 7.3               | "                                  | 0.0039                         |
| Glycin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 m.M.) |                           |                   |                                    |                                |
| + KNCO   | "                         | 7.4               | "                                  | Spur                           |
| Glycin + Harnstoff                               | "                         | 7.3               | "                                  | Spur                           |
| Glycin + KNCO (2 m.M.)                           | "                         | 7.8               | "                                  | Spur                           |
| Glycin   | 48                        | 7.2               | "                                  | 0.0038                         |
| Glycin + $\text{NH}_2\text{COONH}_4$             | "                         | 7.6               | "                                  | 0.0036                         |
| Glycin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$            | "                         | 7.2               | "                                  | 0.0076                         |
| Glycin + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5 m.M.) |                           |                   |                                    |                                |
| + KNCO   | "                         | 7.3               | "                                  | 0.0037                         |
| Glycin + Harnstoff                               | "                         | 7.2               | "                                  | 0.0036                         |

cyaminäquivalenz beträchtlich gross ist. Ferner ist es mit grosser Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass die Guanylierung des Glycins ohne Zusatz von Ammoniumsulfat auf der Einwirkung der von einem Teile Glycin desaminierten Aminogruppe beruht.

### Diskussion.

Methylguanidin im Organismus scheint sich durch Spaltung von Methylguanidinderivat wie Kreatin zu bilden, aber noch ist kein sicherer Beweis dafür erbracht. Wenn man also annimmt, dass der Bildungsmechanismus von Methylguanidin im Organismus analog ist wie der durch Kohle, ist es möglich, dass beim Vorhandensein von Methylamin im Organismus Methylguanidin aus dieser Substanz entsteht. Von  $\omega$ -Aminosäuren wurde Ornithin guanyliert, während Lysin schwer guanyliert zu werden wäre wie im Falle von  $\varepsilon$ -Aminocapronsäure, obwohl die Bestimmung von Guanidinkörper aus ersterem unmöglich war. Diese Tatsache dürfte damit zusammenhängen, dass im Organismus Arginin, eine Guanidoverbindung aus Ornithin, gefunden ist, jedoch Guanillysin, eine Guanidoverbindung aus Lysin, nicht. Nach E. Winterstein und A. Küng (1909) erfolgt auch die Guanylierung von Lysin mit Cyanamid nicht so glatt wie bei Ornithin. Weiter folgte aus diesen Versuchsresultaten, dass Glycin direkt (ohne über Hydantoinäsäure) die Guanylierung durch Ammoniak erhält. Folglich scheinen sich auch andere Guanidoverbindungen direkt aus betreffenden Aminoverbindungen darzustellen. Aber es ist noch unklar, auf welchen Mechanismus Glycin durch Ammoniak guanyliert wird. Weitere Studien über diesen Bildungsmechanismus werden in Zusammenhang mit der Harnstoffbildung durchgeführt werden, da M. Arai (1930) gefunden hat, dass Harnstoff aus Aminosäurelösung durch Einwirkung von Kohle entsteht.

### Zusammenfassung.

- (1) Von Aminen, welche endständige Aminogruppe besitzen, wurde Methylamin am beträchtlichsten guanyliert.
- (2) Von zu diesem Versuche benutzten  $\omega$ -Aminosäuren bestätigte sich die Guanylierung von Glycin,  $\beta$ -Alanin, Taurin, und Ornithin, aber die von Lysin und  $\epsilon$ -Aminocapronsäure nicht.
- (3) Glycin wurde direkt ohne über Hydantoinäsäure durch Ammoniak guanyliert.
- (4) Farbstoffe entstanden aus Ornithin, Lysin, Tryptophan, und Glycylglycin.

Herrn Prof. Dr. S. Kakiuchi möchte ich für seine freundlichen Ratsschläge und seine Kritik bei diesen Versuchen meinen herzlichen Dank aussprechen.

### Literatur.

- R. Andreasch, *Monatsch.*, **23**(1902), 810.  
 M. Arai, *Biochem. Z.*, **226**(1930), 233.  
 M. Bergmann und L. Zervas, *Z. Physiol. Chem.*, **152**(1926), 282.  
 K. Bloch und R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.*, **133**(1940), 633; **134**(1940), 785.  
 H. Erdmann, *Ber.*, **26**(1893), 2438.  
 M. Guerbet, *J. pharm. Chim.*, (6) **10**(1899), 160.  
 H. A. Krebs und K. Henseleit, *Z. physiol. Chem.*, **210**(1932), 33.  
 O. Mendius, *Ann.*, **121**(1862), 129.  
 W. A. Noyes und W. F. Goebel, *J. Am. Chem. Soc.*, **44**(1922), 2286.  
 O. Rhoussopoulos und F. Meyer, *Ann.*, **212**(1822), 254.  
 S. Shibuya, *J. Biochem.*, **35**(1942), 379.  
 O. Wallach, *Ann.*, **312**(1900), 188.  
 C. J. Weber, *J. Biol. Chem.*, **86**(1930), 217.  
 E. Winterstein und A. Küng, *Z. physiol. Chem.*, **59**(1909), 141.

*Biochem. Institut der Med. Fakultät der Kaiserlich. Universität zu Tokyo.*

*Direktor: Prof. Dr. S. Kakiuchi.*