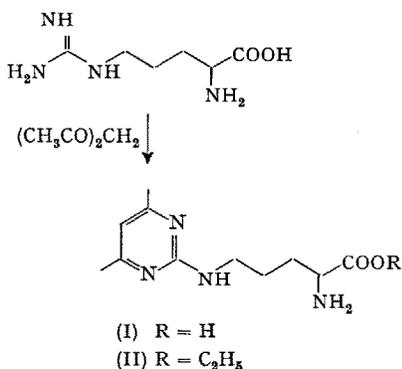


Ein für Massenspektrometrie und Gaschromatographie geeignetes Argininderivat

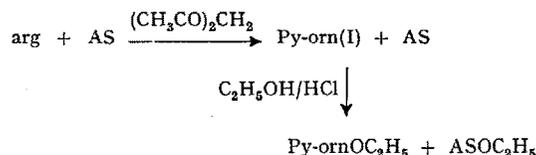
Die massenspektrometrische Untersuchung von Aminosäureäthylestern ist eine einfache und leistungsfähige Methode zur qualitativen Analyse von Aminosäuren und Aminosäuregemischen¹ sowie zur Strukturanalyse unbekannter Aminosäuren². Die im Normalfall angewendete Technik besteht in der Veresterung der Säuren mit Äthanol/HCl und der Umwandlung der dabei gebildeten Hydrochloride in die freien Ester mittels Ammoniak in Methylenchlorid. Auf diese Weise werden alle Aminosäuren, die gewöhnlich in Proteinhydrolysaten angetroffen werden, erfasst, sofern nicht stark basische Gruppen die Freisetzung der Ester unter diesen Bedingungen verhindern. Eine solche Komplikation tritt allerdings bei einer der wichtigsten Aminosäuren, nämlich beim Arginin, auf.

Es war aus diesem Grunde wünschenswert, durch Umwandlung der Guanidinogruppe ein Derivat des Arginins zu bilden, das schwächer basisch als der freie Ester ist und möglicherweise durch herabgesetzte Polarität auch bessere Flüchtigkeits- und Stabilitätseigenschaften aufweist. Dies liess sich, wie wir schon vor längerer Zeit erwähnten, durch Herstellung eines Pyrimidin-Derivates erreichen³. Dasselbe Prinzip wurde auch, wie kürzlich berichtet, von SHEMAKIN et al.⁴ benützt, um argininhaltige Oligopeptide der massenspektrometrischen Sequenzanalyse zugänglich zu machen.

Als Reagens kam dafür in erster Linie Acetylaceton in Frage:



Nach Veresterung des bei der Kondensation gebildeten N⁶-Pyrimidylornithins (I) zu (II) durch die angegebene Technik sollte dann auch Arginin in Gegenwart anderer Aminosäuren (AS) nach folgendem Schema analysierbar sein:



Die fast quantitative Umsetzung von Arginin mit Acetylaceton im Mikromaßstab unter Bildung von (I) gelang, wie die papierchromatographische Kontrolle zeigte, durch zweistündiges Erhitzen der Reaktionspartner in wässrig-alkoholischer Lösung bei pH 8-9 (Bicarbonat). Die Überführung in (II) erfolgte durch anschließende Fischer-Veresterung. Das gleiche Derivat (II) bildet sich auch direkt in äthanolischer Salzsäure beim Stehen der Komponenten bei Raumtemperatur über Nacht (siehe auch⁴). Als Reaktionsprodukte von Acetylaceton mit anderen Aminosäuren treten in bicarbonat-alkalischer Lösung Schiff-Basen auf, die jedoch bei saurer Auf-

arbeitung des Reaktionsgemisches wieder hydrolysiert werden. Ein Selbstkondensationsprodukt des Acetylacetons, bei dem es sich nach Schmelzpunkt und Massenspektrum um das bekannte 3, 5-Dimethyl-2-acetylphenol⁵ handelt, lässt sich bequem durch Extraktion entfernen.

Um die Struktur des erhaltenen Derivates (II) als Pyrimidinabkömmling sicherzustellen, wurde die Reaktion auch mit Arginin allein und in präparativem Maßstab durchgeführt.

0,6 g Arginin (3,45 mM) und 0,6 g Natriumbicarbonat wurden in 6 ml H₂O gelöst, 10 ml Acetylaceton (ca. 0,1 M) und 10 ml Äthanol (96prozentig) zugefügt und das zunächst inhomogene Gemisch 10 h im siedenden Wasserbad erhitzt. Beim Aufnehmen des im Vakuum hergestellten Eindampfrestes in 50 ml H₂O kam das als Nebenprodukt entstandene 3, 5-Dimethyl-2-acetylphenol⁵ (FP: 53-54°, Fe⁺⁺⁺-Reaktion positiv) kristallin zur Abscheidung und wurde durch zweimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt. Die mit HCl auf pH 5 angesäuerte wässrige Phase lieferte beim Eindampfen auf ein kleines Volumen und Stehen im Kühlschrank 508 mg (I) als weisses kristallines Material (FP 265° und Zers.), dem etwas anorganische Salze beigemischt waren.

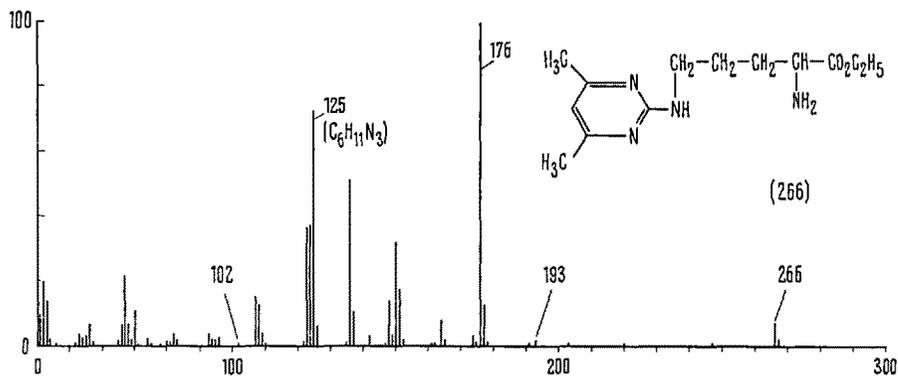
Das Produkt zeigte im Massenspektrum das dem Pyrimidylornithin (I) entsprechende Molekulargewicht 238, eine stark positive Ninhydrin-Reaktion und einen Rf-Wert 0,78 im System tert. Butanol-Eisessig-H₂O (2:1:1).

175 mg rohes, mit Äther gewaschenes Pyrimidylornithin (I) wurden in 20 ml mit trockenem HCl-Gas gesättigtem abs. Äthanol suspendiert und 3 h zum Rückflusssieden erhitzt. Der Eindampfrückstand wurde unter Zusatz von einigen Tropfen abs. Äthanol in trockenem CH₂Cl₂ aufgenommen und etwa 30 sec lang Ammoniakgas durch die Lösung geleitet. Das ausgefallene Ammoniumchlorid wurde durch Filtration entfernt und das Filtrat im Vakuum eingedampft, worauf der verbleibende ölige Rückstand durch Anreiben mit Petroläther zur Kristallisation gebracht werden konnte. Es resultierten 147 mg Äthylester (II) (FP: 72-73°). Das Produkt erschien sowohl gaschromatographisch wie auch massenspektrometrisch einheitlich und änderte beim Umkristallisieren aus Äther-Petroläther seinen Schmelzpunkt nicht mehr.

Das in 0,1 n HCl aufgenommene UV-Spektrum der Verbindung zeigte 2 Maxima bei 229 und 308 nm ($\epsilon_{max} = 18600$ bzw. 5600). Das zum Vergleich aus 2-Chlor-4, 6-dimethylpyrimidin hergestellte 2(n-Butylamino)-4, 6-dimethylpyrimidin zeigte unter den gleichen Bedingungen 2 Maxima bei 231 nm und 310 nm ($\epsilon_{max} = 17500$ bzw. 5600).

Die Flüchtigkeit und thermische Stabilität des Äthylesters (II) erwiesen sich auch für den gaschromatographischen Nachweis von Arginin in Aminosäuregemischen.

- 1 K. BIEMANN, J. SEIBL und F. GAPP, J. Am. chem. Soc. 83, 3804 (1961).
- 2 K. BIEMANN, G. G. DEFFNER, F. C. STEWARD, Nature 191, 380 (1961). - K. BIEMANN, C. LIORÉ, J. ASSELINEAU, E. LEDERER und J. POLONSKY, Biochem. biophys. Acta 40, 369 (1960).
- 3 K. BIEMANN, Mass Spectrometry (McGraw-Hill Book Company, Inc., New York 1962), p. 273.
- 4 M. M. SHEMAKIN, YU. A. OVCHENNIKOV, E. I. VINOGRADOVA, M. YU. FEIGINA, A. A. KIRYUSHKIN, N. A. ALDANOVA, YU. B. ALAKHOV, V. M. LIPKIN und B. V. ROSINOW, Experientia 23, 430 (1967).
- 5 A. HEIKEL, Acta chem. fenn. [B] 8 33 (1935).



Das Massenspektrum des Äthylesters (II).

schen als ausreichend. Die Retentionszeit von (II) ist im Vergleich zu einigen anderen Aminosäureäthylestern in der Tabelle angegeben.

Retentionszeiten: (Trennsäule: Stahl, $5' \times \frac{1}{4}''$, 250 °C, 20% SE-30 auf Chromosorb W 60–80 mesh; Trägergas: Helium, 40 ml/min)

Methioninäthylester	1,1 min.
Hydroxyprolinäthylester	1,25 min.
Phenylalaninäthylester	1,8 min.
Tyrosinäthylester	4,15 min.
Pyrimidylornithinäthylester	7,9 min.

Die Fragmentierung wird sichtlich durch die Anwesenheit des heterocyclischen Ringes stark beeinflusst. Die meist sehr charakteristischen Fragmente von α -Aminosäureäthylestern¹, z.B. das «Ester-Fragment» $\text{H}_2\text{N}=\text{CHCOOC}_2\text{H}_5$ (m/e 102) und das entsprechende «Amin-Fragment» $\text{RCH}=\text{NH}_2$ (m/e 193), treten überhaupt nicht bzw. nur in sehr geringer Menge auf. Letzteres ist allerdings wie beim hierin vergleichbaren Lysinäthylester eine Folge der starken Eliminierung von NH_3 aus dem Amin-Fragment, so dass als dessen Folgeprodukt ein Ion der Masse 176 auftritt, welches sogar dem Basispeak des

Spektrums entspricht. Die Peakgruppe m/e 123, 124 und 125 repräsentiert, wie die entsprechenden Elementarzusammensetzungen zeigen, den Aminopyrimidinrest des Moleküls, wobei zur Bildung der jeweiligen Ionen die Übertragung von 1, 2 und 3 Wasserstoffatomen auf den Heterocyclen erforderlich ist. Über die mechanistische Seite dieser ungewöhnlichen Reaktion soll in einem anderen Zusammenhang berichtet werden.

Summary. Arginine has been converted into a suitable pyrimidine derivative to permit its qualitative analysis in the presence of other amino acids by means of mass spectrometric and gas-chromatographic techniques.

H. VETTER-DIECHTL, W. VETTER⁶,
W. RICHTER⁶ und K. BIEMANN

Massachusetts Institute of Technology, Department of Chemistry, Cambridge (Massachusetts) 02139, USA), 27 December 1967.

⁶ Derzeitige Anschrift: F. Hoffmann-La Roche & Co., Aktiengesellschaft, Basel (Schweiz).

Evidence that Methylguanidine is Retained in Chronic Renal Failure

Monosubstituted guanidines are known to be retained in chronic renal failure (YATZIDIS et al.¹) and their concentration has been found to be proportional to that of creatinine (GIOVANNETTI et al.²). It is also known that guanidine and methylguanidine exert a broad inhibitory effect on several enzymes of biological importance for man (HOLLUNGER³, RAJAGOPOLAN et al.⁴). Furthermore guanidine has been found to inhibit the in vitro oxygen consumption of brain slices (LASCELLES et al.⁵).

Studies from this laboratory provided evidence that guanidine, monosubstituted guanidines, creatine and creatinine increase the amount of the spontaneous autohaemolysis occurring in vitro during incubation of normal blood samples, guanidine and methylguanidine being the most effective (GIOVANNETTI et al.²).

In the present study attempts were made to identify guanidines which accumulate in chronic renal failure.

Material and methods. Blood samples from 10 normal persons and from 12 chronic uraemics were examined. In the uraemic plasma samples the creatinine concentrations ranged from 11–21 mg% (auto-analyzer) and those of the monosubstituted guanidines from 0.6–3.2 mg% (YATZIDIS method¹). Figures in 10 normal persons were previously found to be 0.22 ± 0.19 (GIOVANNETTI et al.²).

¹ H. YATZIDIS, D. OREOPOULOS, N. TSAPARAS, S. VOUDICEARI, A. STAVROULAKIS and S. ZESTANAKIS, *Nature* 212, 1498 (1966).

² S. GIOVANNETTI, P. L. BALESTRI, L. CIONI and M. BIAGINI, *Clin. Sci.*, in press.

³ G. HOLLUNGER, *Acta pharmacol. tox. 11 Suppl. 1* (1955).

⁴ K. RAJAGOPOLAN, K. V. FRIDOWICH and P. HANDLER, *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 19, 49 (1960).

⁵ P. T. LASCELLES and W. H. TAYLOR, *Clin. Sci.* 31, 403 (1966).