

Klinika Nefrologiczna. Instytut Chorób Wewnętrznych. Akademia Medyczna w Lublinie
Konsultant naukowy: prof. dr hab. n. med. Andrzej Wojtczak

Andrzej KSIĄŻEK, Jolanta JUSIAK

**Rozdział pochodnych guanidyny
metodą podziałowej chromatografii bibułowej**

Разделение производных гуанидина методом промокательно-бумажной
хроматографии

The Paper Chromatographic Separation of Guanidine Derivatives

Liczni autorzy stwierdzili wzrost sumy związków guanidynowych w surowicy i moczu u ludzi z niewydolnością nerek (1, 6). Dokładniejsze badania wykazały, że wyraźnemu wzrostowi ulega kwas guanidynobursztynowy (GSA) i metyloguanidyna (MG), podczas gdy poziom kwasu guanidynoocetowego (GAA) i argininy (Ar) nie ulega zmianie (2, 3). Rozdziału badanych związków dokonywano przy zastosowaniu kolumn chromatograficznych wypełnionych żywicą Dowex 50 przy wykorzystaniu do elucji różnych roztworów buforowych o pH od 2,2 do 12,0 lub używano kationowych (Amberlit CG-50) i anionowych (Dowex 50 i Dowex 1) żywic jonowymien-nych (2, 3, 4). Metody te pozwoliły ilościowo oznaczyć badane związki, jednak ich dokładniejszej jakościowej identyfikacji dokonano przy pomocy elektroforezy lub chromatografii bibułowej, w której jako fazę ruchomą stosowano klasyczny układ Partridge'a: butanol+amoniak+woda, przy czym procesy te trwały kilkanaście godzin dając niewielki efekt rozdzielczy (2, 4, 7). Celem naszej pracy było opracowanie szybkiej metody analizy jakościowej wyciągu z moczu i surowicy, dającej dużą dokładność i pewność rozdziału badanych związków.

MATERIAŁ I METODY

Do badań zastosowano opracowaną przez Waksmundzkiego i Soczewińskiego (11) metodę chromatografii na wilgotnej buforowanej bibule, będącą klasyczną metodą chromatografii podziałowej, w układzie: buforowana faza wodna — faza organiczna. Związki występujące w moczu jako elektrolity organiczne są silnie hydrofilne i przy zastosowaniu dwufazowego układu rozdzielczego (faza organiczna i wodna) dzielą się silnie na korzyść fazy wodnej (współczynnik ekstrakcji bliski lub równy zeru). Dla zwiększenia zdolności rozdzielczej dodawano więc do fazy organicznej dwuizooktylowy ester kwasu ortofosforowego (HDEHP), który mógł tworzyć z analizowanym związkiem pary jonowe dobrze ekstrahowane do fazy organicznej (5, 8, 9).

Proces chromatografii przeprowadzano na paskach bibuły Whatman 4 o wymiarach 7×23 cm, ciętych w kierunku poprzecznym do maszynowego. Odległość od brzegu paska do linii startu wynosiła 6 cm, długość drogi migracji fazy ruchomej — 16 cm. Jako fazę nieruchomą stosowano roztwory buforowe według skali McIlvaine'a (0,1 m kwas cytrynowy + 0,2 m Na_2HPO_4) o pH od 2,0 do 7,8, a jako fazę ruchomą chloroform oraz n-pentanol zawierające zmienne stężenia HDEHP. Paski bibuły zwilżano roztworami buforowymi i po wyciśnięciu nadmiaru cieczy arkuszami zwykłej bibuły dosuszano je na drabinkach szklanych w temperaturze pokojowej do współczynnika zwilżenia 1,5 (0,5 g roztworu buforowego na 1 g suchej bibuły). W tym samym czasie na linię startu nakraplano badane substancje w ilości około 0,02 mg każda. Gdy współczynnik zwilżenia wyniósł 1,5, niezwłocznie zawieszano paski w komorach szklanych szczelnie zamkniętych, rozwijając chromatogram metodą spływową. Rozwinięte chromatogramy suszono i wywoływano odczynnikiem bromowym — reakcją Sakaguchii.

W pierwszej fazie stosowano do badań wzorcowe substancje: MG, GSA, GAA, Ar produkcji Sigma Chem, Comp. USA. Do ekstrakcji badanych związków z moczu i surowicy krwi używano żywicy anionowej Dowex 1, X-8, 100—200 mesh przeprowadzonej w formę octanową według metodyki Steina i wsp. (10). Przez kolumnę o wymiarach 30×1 cm napełnioną do wysokości 25 cm żywicą przepuszczano 10 ml moczu doprowadzonego do pH około 5,0—6,0 przy pomocy lodowatego kwasu octowego. Surowicę w ilości 10 ml наносono bezpośrednio na kolumnę. Badane związki ekstrahowano 100 ml 0,25 n CH_3COOH . Zbierane frakcje po 5 ml wykazujące pozytywną reakcję Sakaguchii zagęszczano przy pomocy pompy próżniowej w temp. 40°C do objętości 0,5 ml i poddawano analizie chromatograficznej opisaną metodą. Wymierzone wartości R_F poszczególnych substancji przeliczano na R_M

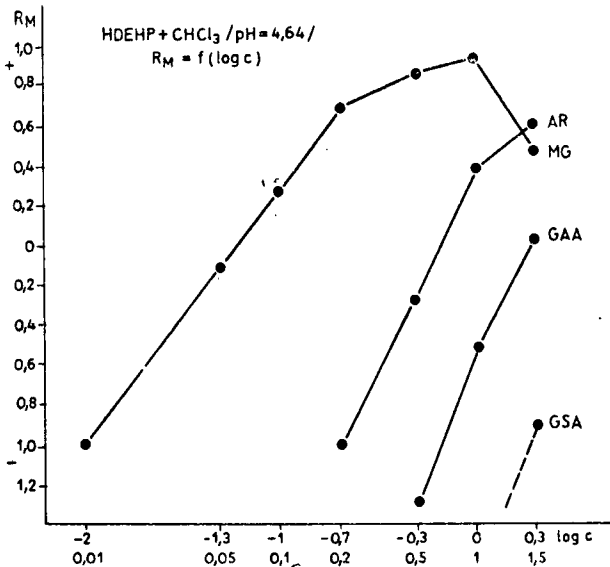
($R_M = \frac{R_F}{1 - R_F}$ — różni się o stałą wartość od logarytmu współczynnika ekstrakcji

badanych substancji w stosowanej metodzie).

Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresach w postaci zależności $R_M = f(\text{pH})$ przy stałym stężeniu HDEHP w fazie organicznej względnie $R_M = f(\log c)$ (gdzie c = stężenie HDEHP w fazie organicznej) przy stałym pH fazy wodnej.

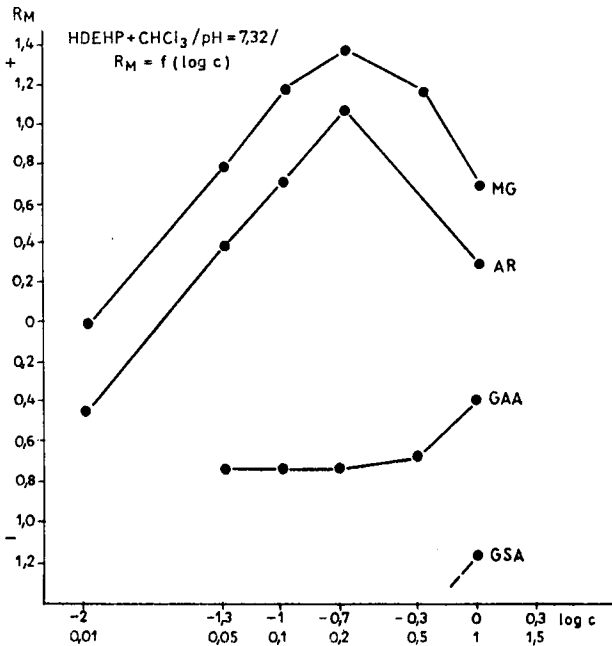
OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Ryc. 1 i 2 przedstawiają wyniki analizy chromatograficznej badanych substancji otrzymane w układzie: chloroform + HDEHP/buforowana faza wodna w postaci krzywych $R_M = f(\log c)$ przy stałych wartościach pH fazy wodnej oraz na ryc. 3 i 4 w postaci krzywych $R_M = f(\text{pH})$ przy stałych stężeniach HDEHP. Jak wynika z wykresów 1 i 2, w miarę wzrostu stężenia HDEHP w fazie chloroformowej następuje migracja analizowanych substancji w kolejności: MG, Ar, GAA, GSA, przy czym migracja dwóch ostatnich związków zaczyna się przy najwyższym stężeniu HDEHP. Z wykresów wynika, że wzrost wartości pH wywiera silny wpływ na wartości R_M argininy, natomiast na pozostałe związki w stopniu tylko niewielkim. Wzrost ekstrakcji (wartości R_M) jest więc uzależniony przede wszystkim od wzrostu stężenia HDEHP w fazie organicznej, a nie od wzrostu wartości pH fazy wodnej. Widać to szczególnie wyraźnie na ryc. 3 przedstawiającej zależność $R_M = f(\text{pH})$ przy zastosowaniu 1m rozt-



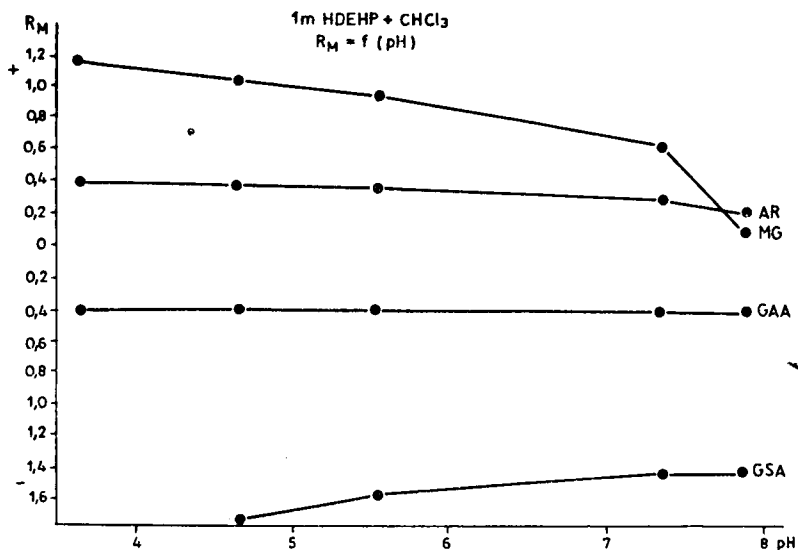
Ryc. 1. Krzywe $R_m = f(\log c)$ arginy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidynoocetowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie chloroformowe roztwory HDEHP/roztwór buforowy o pH=4,64

Curves $R_m = f(\log c)$ arginin (Ar), metyloguanidin (MG), guanidinoacetic acid (GAA) and guanidosuccinic acid (GSA) obtained in system: chloroforms solution HDEHP/ /buffer solution by pH=4,64

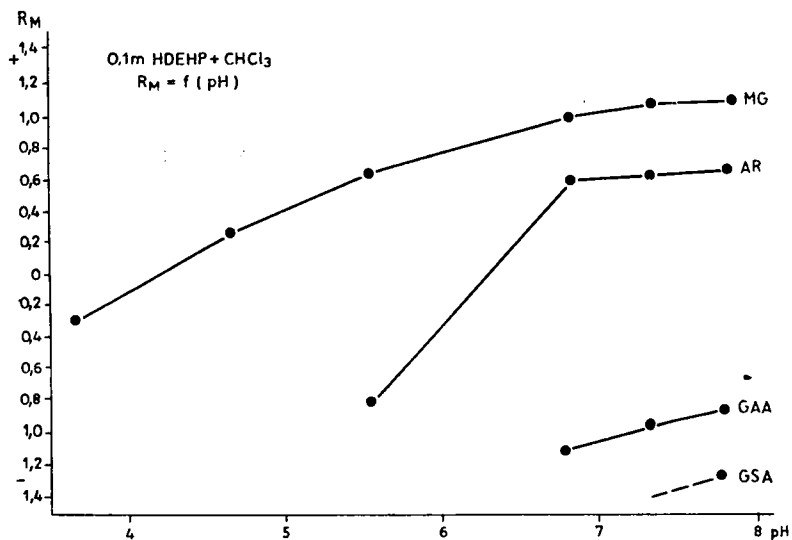


Ryc. 2. Krzywe $R_m = f(\log c)$ arginy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidynoocetowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie: chloroformowe roztwory HDEHP/roztwór buforowy o pH=7,32

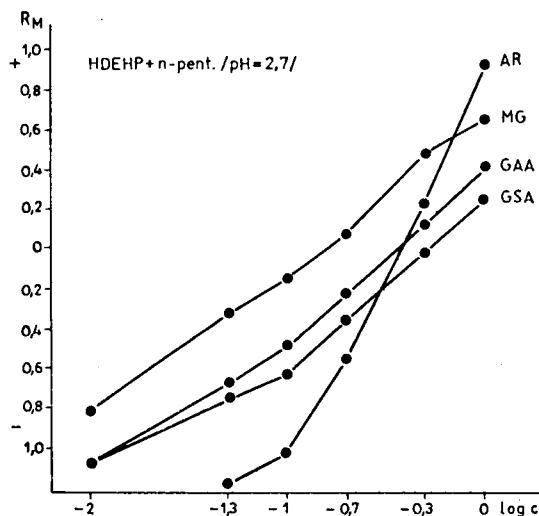
Curves $R_m = f(\log c)$ arginin (Ar), metyloguanidin (MG), acetyloacetic acid (GAA), and guanidosuccinic acid (GSA) obtained in system: chloroforms solution HDEHP/ /buffer solution by pH=7,32



Ryc. 3. Krzywe $R_m=f(pH)$ argininy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidyno-octowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie: 1 molowy roztwór HDEHP w chloroformie/roztwór buforowy
Curves $R_m=f(pH)$ arginin (Ar), methyloguanidin (MG), acetyloacetic acid (GAA) and lguanidinosuccinic acid (GSA) obtained in system: 1 M solution HDEHP in chloroform/buffer solution

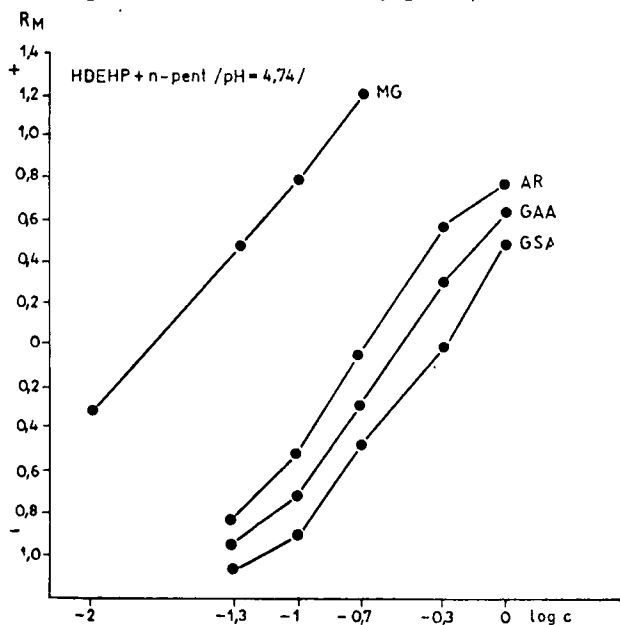


Ryc. 4. Krzywe $R_m=f(pH)$ argininy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidyno-octowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie: 0,1 molowy roztwór HDEHP w chloroformie/roztwór buforowy
Curves $R_m=f(pH)$ arginin (Ar), methyloguanidin (MG), guanidinoacetic acid (GAA) and guanidinosuccinic acid (GSA) obtained in system: 0,1 M solution HDEHP in chloroform/buffer solution



Ryc. 5. Krzywe $R_m = f(\log c)$ argininy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidynooctowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie: roztwory HDEHP w n-pentanolu/roztwór buforowy o pH=2,7

Curves $R_m = f(\log c)$ arginin (Ar), metyloguanidin (MG), guanidinoacetic acid (GAA) and guanidinosuccinic acid (GSA) obtained in systems: solution HDEHP in n-pentanol/buffer solution by pH=2,7



Ryc. 6. Krzywe $R_m = f(\log c)$ argininy (Ar), metyloguanidyny (MG), kwasu guanidynooctowego (GAA) i kwasu guanidynobursztynowego (GSA) otrzymane w układzie: roztwory HDEHP w n-pentanolu/roztwór buforowy o pH=4,74

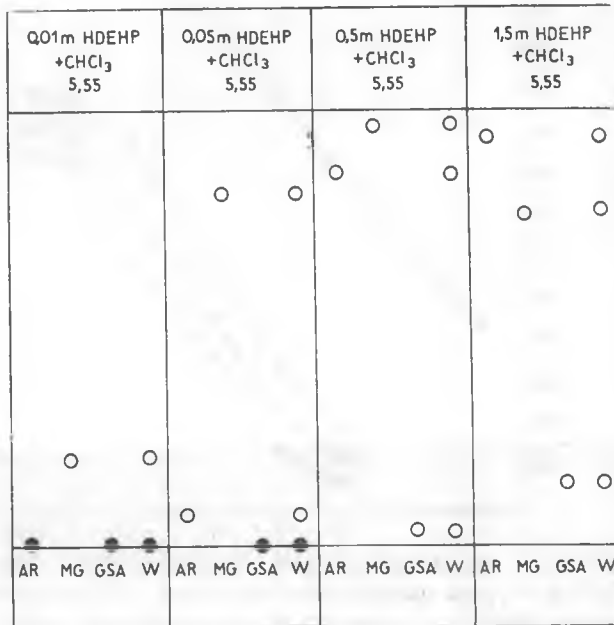
Curves $R_m = f(\log c)$ arginin (Ar), metyloguanidin (MG), guanidinoacetic acid (GAA), guanidinosuccinic acid (GSA) obtained in system: solutions HDEHP in n-pentanol/buffer solution by pH=4,74

woru HDEHP w chloroformie. Zmiana pH w zakresie od 3 jednostek do 8 nie wywiera żadnego wpływu na zmianę współczynnika ekstrakcji Ar i GAA, natomiast wyraźnie zmniejsza ekstrakcję MG i tylko w nieznacznym stopniu zwiększa ekstrakcję GSA. Przy znacznie mniejszym stężeniu HDEHP=0,1m (ryc. 4) widać już wpływ pH na zmianę współczynnika ekstrakcji substancji.

Ryc. 5 i 6 przedstawiają zależność $R_M = f(\log c)$ przy zastosowaniu n-pentanolu jako rozcieńczalnika HDEHP. Jak widać, n-pentanol jest znacznie lepszym ekstrahentem od chloroformu, ponieważ przy wzroście stężenia HDEHP wzrasta znacznie ekstrakcja wszystkich substancji do fazy organicznej. Wzrost wartości pH powoduje początkowo wzrost ekstrakcji MG i silną zmianę współczynnika ekstrakcji Ar, natomiast przy wyższym pH wartości R_M wszystkich substancji nie ulegają prawie żadnym zmianom. Należy jednak stwierdzić, że układ ten jest mało selektywny, ponieważ wartości R_F , Ar, GSA i GAA są podobne i układ ten nie nadaje się do ich identyfikacji natomiast może być stosowany do ich zespolowej ekstrakcji.

Tak więc układy: chloroform+HDEHP o stężeniu od 0,1m do 1m/roztwory buforowe o pH od 3 do 7,5 mogą nadać się do szybkiej identyfikacji wymienionych substancji.

Na ryc. 7 przedstawiono przykłady chromatogramów niektórych otrzymanych wyciągów z moczu i osocza u ludzi z końcową niewydolnością



Ryc. 7

nerek, poddanych analizie chromatograficznej opracowanymi uprzednio metodami. Jak wynika z tej ryciny, w moczu i osoczu występują wszystkie badane związki. Najwyraźniej uwidoczniła się MG i Ar, natomiast oba kwasy dawały nieco słabsze plamy.

Z przedstawionych badań wynika, że powyższy układ chromatograficzny dobrze nadaje się do identyfikacji pochodnych N-podstawnych guanidyny z płynów ustrojowych i może znacznie skrócić czas ich identyfikacji w porównaniu z stosowanymi dotychczas metodami oznaczeń ilościowych i jakościowych.

PIŚMIENNICTWO

1. Anders J. E., Myers V. C.: *J. Biol. Chem.* **118**, 137—148, 1937.
2. Cohen B. D., Stein J. M., Bonas J. E.: *Amer. J. Med.* **45**, 63—71, 1968.
3. Cohen B. D.: *Uremia*, G. Thieme Verl., Stuttgart 1—7, 1972.
4. Dobbelsstein H. H., Edel H., Schmidt M., Weinzierl M.: *Klin. Wschr.* **49**, 348—357, 1971.
5. Jusiak L.: *Acta Pol. Pharm.* **31**, 635—642, 1974.
6. Mayor R. H., Weber C. J., Rumold M. J.: *Arch. Intern. Med.* **64**, 993—998, 1939.
7. Natelson S., Stein I., Bonas J. E.: *Microchem. J.* **8**, 371—386, 1964.
8. Soczewiński E., Rojowska M.: *J. Chromatogr.* **32**, 364—371, 1968.
9. Soczewiński E., Rojowska M.: *Roczn. Chem.* **47**, 1025—1030, 1973.
10. Stein I. M., Burton C. D., Cohen M. D., Kornhauser R. S.: *New Eng. J. Med.* **280**, 926—930, 1969.
11. Waksmundzki A., Soczewiński E.: *Nature* **184**, 977—978, 1959. Otrzymano 7 XI 1975.

РЕЗЮМЕ

Разработан метод разделения производных гуанидина при помощи распределительной хроматографии на буферной промокательной бумаге с одновременным использованием бис/2-этилгексил/ортофосфорной кислоты в качестве ионита с объемом рН от 2,0 до 7,8. Самой лучшей распределительной системой оказался хлороформный раствор HDEHP и буферный раствор рН=5,5.

Вышеназванная система оказалась пригодной для качественной идентификации исследованных связей в моче и сыворотке крови у людей.

SUMMARY

The method of the separation of guanidine derivatives was elaborated using paper chromatography in the system bis (2-ethylhexyl) phosphoric acid/buffer solutions of pH 2,0—7,8. The best separation was achieved on paper impregnated with a buffer solution at pH=5,5 using the HDEHP in CHCl₃ solution as a mobil phase. The method is useful in the identification of investigated compounds in urine and in human serum.

