

CHROM. 5988

EIN SPEZIFISCHER NACHWEIS VON THREONIN BZW. *allo*-THREONIN AUF DÜNNSCICHT- (UND PAPIER-)CHROMATOGRAMMEN

H. STÜBCHEN-KIRCHNER

Universitätsklinik für Interne Medizin, Graz (Österreich)*

(Eingegangen am 29. November 1971; geänderte Fassung am 18. Februar 1972)

SUMMARY

Specific method for the detection of threonine and allo-threonine on thin-layer (and paper) chromatograms

If chromatograms (thin-layer and paper) and electropherograms dyed with a collidine-containing ninhydrin reagent are sprayed with a 1% ethanolic KOH solution, threonine and *allo*-threonine show a pink to bright red fluorescence, after several hours and on the next day, respectively. The necessary conditions for the development of this fluorescence are — sufficiently high humidity of the air and enough (day) light falling onto the chromatograms. It is favourable to put the thin-layer plates into a box equipped with a container with 72% v/v glycerol.

If the same chromatograms are heated immediately before the treatment with ethanolic KOH (20 min, 80°), threonine transiently shows a light green, and *allo*-threonine and serine a dark and dim green fluorescence. At higher humidity the difference between *allo*-threonine and threonine diminishes, whereas the behaviour of serine is not affected. Subsequent formation of red fluorescence of threonines is favoured by heating before the KOH treatment. While the presence of collidine in the ninhydrin reagent is advantageous for the formation of the red fluorescence, it is essential for the transient formation of the green fluorescence.

EINLEITUNG

Als spezifische Nachweisreaktionen für die Hydroxyaminosäuren standen bisher im wesentlichen nur Methoden zur Verfügung, die auf oxydativer Spaltung der genannten Verbindungen mittels Perjodat zu Aldehyd und Ammoniak beruhten, wobei letzteres mit Hilfe von Nessler Reagens¹ oder Acetylaceton² erkannt werden kann. Der Nachweis des aus Threonin entstehenden Acetaldehyds durch die Blaufärbung mit Nitroprussid-Natrium und einem sekundären Amin (Piperidin²) stellt eine spezifische Reaktion auf Threonin dar.

Derartige Nachweisreaktionen erfassen allerdings nur die Hydroxyaminosäuren, aber es wäre wünschenswert, diese — möglichst in einem Arbeitsgang — zugleich mit den übrigen Aminosäuren nachweisen zu können.

Verschiedentlich waren schon sogenannte polychromatische Nachweisreagentien

* Vorstand: Prof. Dr. K. GORSCH.

vorgeschlagen worden, die durch Zusatz von Collidin^{3,4}, Cyclohexylamin⁵ oder ähnlichen Substanzen zu einer Ninhydrinlösung teilweise sehr unterschiedliche Farbnuancen für einige Aminosäuren ergeben. Zugabe von Metallsalzen, vorzugsweise Cu^{2+} (z.B. Methode von MOFFAT UND LYTLE⁶) liess eine noch weitergehende Differenzierung zu. Threonin unterscheidet sich dabei allerdings meist zu wenig von den benachbart auftretenden Substanzen, um auf Grund der Färbung eine sichere Identifizierung zu erlauben.

Vor einiger Zeit hatten wir beobachtet, dass durch Nachbehandeln der ninhydringefärbten (mit einem Collidin enthaltendem Reagens⁷) Chromatogramme mit äthanolischer KOH einige Aminosäuren charakteristische, z.T. leuchtende Fluoreszenzen ergaben⁸. Unter bestimmten Bedingungen zeigt jedoch auch Threonin eine eigentümliche Fluoreszenz, deren Auftreten durch entsprechende Massnahmen zu einer verlässlichen, spezifischen und empfindlichen Nachweisreaktion gestaltet werden kann.

EXPERIMENTELLES

Verwendet wurden DL-Threonin der Firma Merck, vermutlich nicht *allo*-frei, L-Threonin *allo*-frei der Firma Fluka und DL-*allo*-Threonin der Firma Schuchardt. Die anderen Präparate von Aminosäuren, Aminosäure-Derivaten und Peptiden stammten von den genannten Firmen, bzw. auch von den Firmen Serva und Calbiochem.

Für die Dünnschichtchromatographie dienten Cellulose-Fertigplatten der Firma Merck 20 × 20 cm ohne Fluoreszenz-Zusatz.

Zur Anfärbung der Dünnschicht-Chromatogramme, sowie auch von Papier-Hochspannungselektropherogrammen, benützten wir ein von CLOTTEN UND CLOTTEN empfohlenes Reagens⁷, eine 0.4%ige Lösung von Ninhydrin in Propanol-2, die 5 Vol. % 2,4,6-Collidin enthält (p.a. Reagentien der Firma Merck). Für einige Versuche wurde auch der Collidinzusatz fortgelassen. Das Nachsprühen mit 1 % äthanolischer KOH erfolgte etwa 24 Std. (oder später) nach der Ninhydrin-Färbung. Die Fluoreszenzen wurden mit einer Universal-UV-Lampe der Firma Camag bei 350 nm beobachtet.

Zur Einstellung einer gewünschten relativen Luftfeuchtigkeit wurden kleine Glaswannen oder Porzellanschalen mit verschiedenen Glycerin-Wassermischungen in Entwicklungskammern, bzw. Exsiccatoren gestellt, die Dünnschichtplatten nach Chromatographie und Wegtrocknung des Fließmittels eingebracht und nur jeweils zum Besprühen, bzw. zur Beobachtung herausgenommen. Verwendet wurde wasserfreies Glycerin ÖABg der Firma Apoka (von einer Bestimmung des geringen Restwassergehaltes wurde abgesehen).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Werden Chromatogramme (Cellulose DC-Platten oder Papierchromatogramme bzw. Elektropherogramme) nach der Färbung mit einem collidinhaltigen Ninhydrin-Reagens mit äthanolischer KOH (am besten mehrmals) übersprüht, so zeigt Threonin wie auch *allo*-Threonin mehrere Stunden, bzw. erst am nächsten Tag, eine charakteristische und spezifische rosarote bis kräftig rote Fluoreszenz, vorausgesetzt, dass die

relative Luftfeuchtigkeit genügend hoch ist (etwa ab 45–50 %; eine genaue Grenze lässt sich nicht angeben). Diese Fluoreszenz zeigt sich allgemein umso eher, je höher der Luftfeuchtigkeitsgehalt ist. Bei der *allo*-Verbindung scheint diese Abhängigkeit aber weniger ausgeprägt zu sein, so tritt die Fluoreszenz von *allo*-Threonin bei höheren Feuchtigkeitswerten meist erst später voll in Erscheinung. Anders verhält es sich bei mässiger Feuchtigkeit (etwa unter 50 %), ja die Grenze, bis zu der die Fluoreszenz noch zu sehen ist, liegt für die *allo*-Verbindung überhaupt etwas tiefer.

Um auch bei trockeneren Bedingungen die Threonine nachweisen zu können, stellten wir die Platten in mit verschiedenen Glycerin–Wasser–Mischungen beschickte Kammern. Günstig zeigte sich hierbei ein Glycerin-Gehalt von etwa 70–75 Vol. % — wir arbeiteten dann zumeist mit 72 Vol. % (\approx 76 Gew. %) Glycerin (theoretisch etwa 54 % rel. Luftf. (Lit. 9), in Wirklichkeit etwas höher wegen geringer Wasserhältigkeit des Reinglycerins).

Eine gewisse Abhängigkeit von den Feuchtigkeitsverhältnissen im Laborraum lässt sich auf diese Art freilich nicht vermeiden (Öffnen der Kammern, Herausnehmen der Platten zum Besprühen und zur Beobachtung), wodurch es besonders bei grossen Feuchtigkeitsunterschieden zwischen Aussenluft und Kammer bezüglich des Auftretens und der Intensität der Fluoreszenzen doch zu gewissen Differenzen kommt; dennoch entsprach unsere Versuchsanordnung zumeist völlig und die Verwendung einer etwas aufwendigeren Apparatur, wie beispielsweise von WELLINGTON¹⁰ angegeben, war nicht erforderlich.

Ein zweiter wesentlicher Faktor für das Zustandekommen der Threonin-Fluoreszenz ist Lichteinwirkung (am besten helles, diffuses Tageslicht) auf die ninhydringefärbten Chromatogramme sowohl vor, wie auch nach der Behandlung mit äthanolischer KOH. Hierbei scheinen Licht- und Feuchtigkeitswirkung einander teilweise ersetzen zu können.

Weitgehender Lichtausschluss verhindert aber selbst bei Einstellen der Platten in Kammern mit 72 % Glycerin das Auftreten der roten Fluoreszenz vollständig, während die übrigen bereits früher⁸ erwähnten Fluoreszenzen auch unter diesen Bedingungen zumeist völlig normal in Erscheinung treten.

Wurden die Platten entweder nur vor oder nur nach der KOH-Einwirkung im Dunkeln belassen (stets über 72 % Glycerin), so war die Threonin-Fluoreszenz zwar deutlich schwächer, aber doch noch zu sehen.

Eine zweite recht charakteristische Nachweismöglichkeit für Threonin ergibt sich daraus, dass nach einem Erhitzen (etwa 20 Min auf *ca.* 80°) der Ninhydrin-gefärbten Platten und sofort nach dem Abkühlen erfolgenden Besprühen mit 1 %ig äthanolischer KOH eine hellgrüne (bis schmutzig bläulich-grüne, manchmal auch gelbgrüne) Fluoreszenz auftritt, die allerdings nur kurze Zeit (oft nur 10–20 Min oder kürzer) sichtbar bleibt. Schliesslich macht sie nach einer gewissen Übergangszeit — die entsprechenden Bedingungen vorausgesetzt — der oben erwähnten roten Fluoreszenz Platz.

Mitunter ist diese grünliche Fluoreszenz auch ohne Erhitzen gleich nach dem Besprühen mit äthanolischer KOH erkennbar, jedoch nur bei relativ geringer Luftfeuchtigkeit und auch dann zumeist nur schmutzig-grünlich, jedenfalls stets weniger ausgeprägt als bei erhitzten Platten.

In gewisser Weise ähnlich dem Threonin verhält sich bei dieser Reaktion Serin, doch ist dessen Fluoreszenz gegenüber der des Threonins dunkler und schmut-

ziger-grün und verschwindet meist noch etwas rascher, sodass eine Unterscheidung — zumindest nach einigen Minuten — leicht möglich ist. Homoserin gibt dagegen überhaupt keine Fluoreszenz.

Bemerkenswert ist aber, dass das Fluoreszenzverhalten von *allo*-Threonin bei dieser Reaktion schon mehr dem Serin als dem Threonin ähnelt, besonders bei mässiger bis mittlerer Luftfeuchtigkeit. Bei höherer Feuchtigkeit wird *allo*-Threonin dem Threonin ähnlicher und die Unterschiede werden undeutlicher oder verschwinden völlig (z.B. meist bei Platten über 72 % Glycerin). Bei Platten, die sich frei im Laboratorium — bei nicht allzu hoher Raumfeuchtigkeit (etwa bis 60 %) — oder über konzentrierteren Glycerinlösungen befanden, ist jedoch mit dieser Reaktion eine gute Unterscheidung zwischen Threonin und *allo*-Threonin möglich. Gemische der beiden lassen sich dabei natürlich nicht aufschlüsseln.

Schwieriger wird auch der Nachweis in Gegenwart anderer Aminosäuren (Ähnlichkeit von Threonin mit der *allo*-Verbindung oder Serin, wenn diese allein vorliegen).

Auf Papier ist diese vorübergehende Grünfluoreszenz von Threonin zumeist undeutlicher (mehr schmutzig blau-grün). Da *allo*-Threonin und Serin dann meist schon fast gar keine Fluoreszenz zeigen, ist jedoch auch hier eine gewisse Unterscheidungsmöglichkeit gegeben.

Eine gewisse Ähnlichkeit besteht zwischen der grünen Threonin-Fluoreszenz und der hellgrünen (aber beständigen) von Phenylalanin⁸ sowie mit der vorerst gelbgrünen (später in Blau übergehenden) des Arginin^{8,11}, doch sind Verwechslungen schon wegen der fast stets verschiedenen Positionen auf den Chromatogrammen kaum zu befürchten.

Die Anwesenheit von Collidin in der Ninhydrinlösung ist für das Auftreten der grünen Threonin-Fluoreszenz notwendig; bei Verwendung des collidinfreien Reagens ist sie nicht zu beobachten.

Der Einfluss von anderen polychromatisch wirkenden Zusätzen auf diese Reaktion wie auch auf die Ausbildung der roten Fluoreszenz muss noch untersucht werden; interessanterweise versagt nach Anwendung eines Dicyclohexylaminhaltigen Fliessmittels von ARX UND NEHER¹² diese Reaktion und auch die Rotfluoreszenz kann selten (gut) beobachtet werden.

Vorteilhaft ist, dass das spätere Auftreten der roten Fluoreszenz durch das Erhitzen vor dem Besprühen mit Alkali begünstigt wird. Sie tritt zumeist etwas rascher ein, und zeigt sich oft auch noch in Fällen, wenn Feuchtigkeit, bzw. Lichtzufuhr schon etwas zu niedrig liegen.

So war einmal auf einer über 72 % Glycerin unter weitgehendem Lichtabschluss aufbewahrten Platte die rötliche Threonin-Fluoreszenz (wie zuvor die grüne, die nicht lichtabhängig sein dürfte) zwar schwach, aber noch deutlich wahrnehmbar.

Bei ausgesprochen ungünstigen Bedingungen ist aber auch bei erhitzten Platten die rote Threonin-Fluoreszenz nicht zu sehen.

Unter optimalen Verhältnissen (Feuchtigkeit, Lichtzufuhr, collidinhaltiges Ninhydrinreagens, Erhitzen vor der KOH-Behandlung) stellt das Auftreten dieser roten Fluoreszenz eine recht empfindliche Nachweisreaktion für Threonin, bzw. *allo*-Threonin dar. 0.1 μg — mitunter sogar noch Bruchteile davon — lassen sich noch recht gut auf Dünnschichtplatten erkennen.

Bei höheren Konzentrationen — unter etwas ungünstigeren Bedingungen oft

auch im Normalbereich (1–2 μg) — fluoresziert oft nur der Rand des Flecks und das Innere bildet einen dunklen, nicht fluoreszierenden Kern, was aber die Erkennbarkeit keineswegs beeinträchtigt. Auch in Gegenwart nicht allzu grosser Mengen anderer, an derselben Stelle befindlicher Aminosäuren wird die Nachweisbarkeit von Threonin nicht wesentlich eingeschränkt.

So konnte etwa in Anwesenheit der doppelten Menge von Glutaminsäure — die in vielen Butanol und Essigsäure enthaltenden Fließmitteln weitgehend an derselben Stelle auftritt — Threonin leicht in Form eines leuchtend hellrot fluoreszierenden Ringes erkannt werden, während das Innere des betreffenden Fleckes dunkelblau (Glutaminsäure!) fluoreszierte⁸.

Demgegenüber ist zwar die grüne Fluoreszenz weit weniger empfindlich (Grenze meist bei 0.5–1 μg) und auch viel störungsanfälliger bei Anwesenheit anderer Aminosäuren an derselben Stelle, aber doch recht charakteristisch.

Für die beschriebene Nachweisreaktion ist offenbar das Vorliegen der freien OH-Gruppe am Threonin Voraussetzung. So weisen O-Methyl-threonin und Threonin-phosphorsäure weder die grüne, noch die rote Fluoreszenz auf.

Auch die untersuchten Threonin-hältigen Peptide zeigten diese Fluoreszenz nicht (vgl. Tabelle I). Die blaugrüne Fluoreszenz von Methionylthreonin dürfte eher auf die Anwesenheit des Methionylrestes im Peptid zurückzuführen sein, denn L-Methionyl-L-leucin verhält sich analog.

Das sich von Threonin durch Decarboxylierung ableitende Amin, das Isopropanolamin (1-Amino-2-propanol) zeigte zwar selbstverständlich positive Nin-

TABELLE I

FLUORESZENZEN VON THREONIN UND EINIGEN DERIVATEN NACH ANFÄRBUNG MIT COLLIDIN-HÄLTIGER NINHYDRINLÖSUNG UND NACHBEHANDLUNG MIT ÄTHANOLISCHER KOH

<i>Verbindung</i>	<i>Fluoreszenzfarbe</i>	<i>Bedingungen und sonstige Bemerkungen</i>
Threonin	(a) hellrot (b) hellgrün	Genügende Feuchtigkeit, Lichteinwirkung, Nachweisgrenze etwa 0.1 μg . Bei Erhitzen vor KOH-Einwirkung; sonst feuchtigkeits- und lichtunabhängig, unbeständig, geht (unter entsprechenden Bedingungen) über in (a); Nachweisgrenze 0.5–1 μg .
<i>allo</i> -Threonin	(a) hellrot (b) dunkler schmutzigrün	Bedingungen im wesentlichen wie für Threonin. Bei Erhitzen vor KOH-Einwirkung; bei höherer Feuchtigkeit wie Threonin, sonst alles wie bei Threonin.
O-Methyl-threonin	keine Fluoreszenz	
Threonin-phosphorsäure	keine Fluoreszenz	
L-Alanyl-L-threonin	schmutzig blaugrau, mitunter gelbgrün	
L-Isolucyl-L-threonin	Ansätze zu violetter Fluoreszenz	Meist nur am Rand des Flecks zu sehen.
L-Valyl-L-threonin	Ansätze zu violetter Fluoreszenz	Meist nur am Rand des Flecks zu sehen.
L-Methionyl-L-threonin	blaugrün	
1-Amino-2-propanol	keine Fluoreszenz	

hydrinreaktion, interessanterweise aber keinerlei Fluoreszenz, im Gegensatz zu β -Phenyläthylamin, das die hellgrüne Phenylalanin-Fluoreszenz⁸ ebenso gibt¹³.

Da somit alle bisher untersuchten Threoninderivate die beschriebenen Fluoreszenzerscheinungen nicht aufwiesen, müssen diese als nur für freies Threonin charakteristisch betrachtet werden. *allo*-Threonin zeigt dasselbe Verhalten mit gewissen Unterschieden, die besonders in Bezug auf die vorübergehend auftretende grüne Fluoreszenz erheblich sind und eine Unterscheidungsmöglichkeit zulassen.

ZUSAMMENFASSUNG

Werden Chromatogramme (Cellulose DC-Platten, oder Papier-Chromatogramme, bzw. Elektropherogramme) nach der Anfärbung mit einem Collidin-hältigen Ninhydrin-Reagens mit 1 %iger äthanolischer KOH übersprüht, so zeigt Threonin, sowie *allo*-Threonin nach mehreren Stunden, bzw. am nächsten Tag, eine rosa bis hellrote Fluoreszenz unter der Voraussetzung, dass die relative Luftfeuchtigkeit genügend hoch ist und auch ausreichend (Tages-) Licht auf die Chromatogramme gelangt. Günstig ist es, die Dünnschichtplatten in ein Gefäß einzustellen, das mit 72 vol. %igem Glycerin beschickt wurde.

Werden die Ninhydrin-gefärbten Chromatogramme unmittelbar vor der Behandlung mit äthanolischer KOH etwa 20 Min auf *ca.* 80° erhitzt, so zeigt Threonin vorübergehend eine hellgrüne, *allo*-Threonin und Serin dagegen mehr eine dunkler und schmutzig grüne Fluoreszenz. Bei höherer Luftfeuchtigkeit wird der Unterschied von *allo*-Threonin gegenüber Threonin geringer, das Verhalten von Serin ändert sich nicht. Die spätere Ausbildung der roten Fluoreszenz der Threonine wird durch das Erhitzen vor der KOH-Behandlung begünstigt. Die Anwesenheit von Collidin im Ninhydrin-Reagens ist für das Zustandekommen der roten Fluoreszenz vorteilhaft, für das Auftreten der vorübergehenden grünen sogar notwendig.

LITERATUR

- 1 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 33.
- 2 D. P. SCHWARTZ, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1855.
- 3 A. J. WOIWOD, *J. Gen. Microbiol.*, 3 (1949) 312; bzw. *J. Chromatogr.*, 3 (1960) 278.
- 4 P. R. LEWIS, *Biochem. J.*, 52 (1952) 330.
- 5 T. L. HARDY, D. O. HOLLAND UND J. H. C. NAYLER, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 971.
- 6 E. D. MOFFAT UND R. J. LYTLE, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 926.
- 7 R. CLOTTEN UND A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, Thieme, Stuttgart, 1962.
- 8 H. STÜBCHEN-KIRCHNER, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 1049.
- 9 F. T. CARSON, *Paper Trade J.*, Oct., 1931; zitiert in *Natl. Bur. Stand. (US)*, Circ. No. 512 (1951).
- 10 E. F. WELLINGTON, *Can. J. Chem.*, 31 (1953) 484.
- 11 A. S. JONES UND T. W. THOMPSON, *J. Chromatogr.*, 10 (1963) 248.
- 12 E. ARX UND R. NEHER, *J. Chromatogr.*, 12 (1963) 329.
- 13 H. STÜBCHEN-KIRCHNER, in Vorbereitung.