

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej, Wydział Lekarski, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr Irena Krzeczowska

Stanisław SZCZEPANIAK

**Badania nad zastosowaniem krajowych kationitów fenolosulfonowych
w analizie ilościowej aminokwasów. II. Oznaczanie ilościowe
aminokwasów rozdzielonych na kolumnie**

**Исследования возможности применения сульфифеноловых катионитов
отечественного производства в количественном анализе аминокислот
Часть II. Количественное определение аминокислот после разделения
на колонке**

**Investigations on the Application of Polish Phenolsulphonic Cation
Exchange Resins in the Quantitative Analysis of Amino Acids.
II. Quantitative Determination of Amino Acids after Separation
on Chromatographic Column**

Przeprowadzono ilościowe oznaczenia aminokwasów w poszczególnych frakcjach wycieku za pomocą reakcji ninhydrynowej. Do celów ilościowych przystosowali ją po raz pierwszy Moore i Stein w 1948 r. (3). Badacze ci wykazali wówczas, że w tej reakcji oprócz ninhydryny winna brać udział tzw. hydryndantyna, czyli zredukowana postać ninhydryny. Jako rozpuszczalnika dla hydryndantyny użyli eteru monometylowego glikolu etylenowego, czyli tzw. metylcellosolwu. W późniejszych latach szereg autorów (2, 6, 7, 11, 12) wprowadziło pewne ulepszenia i modyfikacje do metody Moore'a i Steina. Jednak każdy z nich stosował metylcellosolv w charakterze rozpuszczalnika dla zredukowanej ninhydryny. Jedynie Troll i Cannan (10) prowadzili reakcję ninhydrynową w środowisku pirydyny i fenolu. Metylcellosolv jest odczynnikiem importowanym i trudno dostępnym na rynku krajowym, a pirydyna wykazuje działanie toksyczne na organizm ludzki. Zwrócono więc uwagę na możliwość zastąpienia metylcellosolwu glikolem dwuetylenowym łącznie z fenolem i izopropanolem (9).

W naszej pracy zastosowano tę modyfikację do oznaczania stężenia aminokwasów, uprzednio rozdzielonych na kolumnie wg sposobu opisanego w części I (Szczepaniak, 1964). Poza tym oznaczono względne wydajności reakcji ninhydrynowej, zachodzącej w środowisku glikolu dwuetylenowego dla poszczególnych aminokwasów. Otrzymane dane pozwoliły obliczyć stopień odzysku aminokwasów z kolumny jonowymiennej. Poczyniono również pewne zmiany w sposobie wykonywania oznaczenia w stosunku do przepisu podanego poprzednio (9).

MATERIAŁY I APARATURA

1. Odczynniki: a) Ninhydryna cz. Politechnika Śląska Gliwice, b) Glikol dwuetylenowy cz. „Schuchardt” NRF, c) Izopropanol cz. Zakłady Chemiczne Oświęcim, d) KCN i e) Fenol cz. d. a. Zakłady Chemiczne Oświęcim.

2. Przybory i aparatura: a) Mikropipetka na 0,2 ml, b) Pipetka na 2 ml, c) 40 wysokich probówek laboratoryjnych, d) 40 probówek wirówkowych, e) Okrągły statyw metalowy na 40 probówek, oraz f) Fotoelektryczny kolorymetr produkcji radzieckiej typ FEK-56.

BADANIA WŁASNE

1. Sporządzanie roztworów

Do przeprowadzenia oznaczenia potrzebne były następujące roztwory:

Roztwór 1. KCN w glikolu dwuetylenowym: 10 ml 0,01 m KCN w roztworze wodnym przenoszono do kolby miarowej na 1000 ml, dopełniano glikolem dwuetylenowym do kreski i zawartość kolby dokładnie wymieszano.

Roztwór 2. Fenol w alkoholu izopropylowym: 800 g fenolu zadawano 200 ml izopropanolu i ogrzewano na łaźni wodnej aż do całkowitego rozpuszczenia.

Roztwór 3. Mieszanina roztworu 1 i 2 w stosunku 1 : 1. 750 ml roztworu 1 przenoszono do ciemnej butli, dodawano 750 ml roztworu 2 i zawartość naczynia dobrze mieszano.

Roztwór 4. Ninhydryna w izopropanolu: 5 g ninhydryny przenoszono do kolbki miarowej na 100 ml i dopełniano do kreski alkoholem izopropylowym. Zawartością kolbki kilkakrotnie wstrząsano i odstawiono na noc. Wszystkie roztwory przechowywano w chłodnym miejscu i w ciemnych butelkach.

Wykonanie oznaczenia

Wywoływanie barwy przeprowadzano wg przepisu podanego uprzednio, z tym że KCN w glikolu dwuetylenowym dodawano do analizowanej próbki jednocześnie z roztworem fenolu. Do 0,2 ml badanej próbki dodawano 2 ml roztworu 3, następnie 0,2 ml odczynnika ninhydrynowego, a pozostałe czynności były zgodne z przepisem poprzednim (9). Po wywołaniu barwy do roztworów znajdujących się w probówkach dodawano 5 ml mieszaniny izopropanol—woda (1 : 1). Zawartość probówek o bardzo intensywnej barwie rozcieńczano, dodając 10 lub 15 ml mieszaniny izopropanol—woda. Ekstynkcję mierzono za pomocą elektrycznego fotokolorymetru produkcji radzieckiej FEK-56. Stosowano kiuwety o pojemności 5 ml i grubości warstwy 1 cm oraz filtr zielony o przepuszczal-

ności 540 mμ. Do kreślenia krzywych kalibracji sporządzano roztwory wzorcowe aminokwasów w następujący sposób. Najpierw przygotowywano roztwór danego aminokwasu o stężeniu 1 μM/ml. W tym celu pobierano odpowiednią ilość ml roztworu podstawowego, przenoszono do kolbki o pojemności 50 ml i dopełniano do kreski mieszaniną: bufor cytrynianowy o pH 3,5 i 2,5 m octan sodu (4 : 1). Przez rozcieńczenie roztworu o stężeniu 1 μM/ml za pomocą mieszaniny buforu z octanem sodu otrzymywano wzorce o stężeniach: 0,75, 0,50, 0,25, 0,125 μM/ml. Zmierzone ekstynkcje dla wszystkich stężeń danego aminokwasu dały podstawę do wykreślenia krzywej wzorcowej.

3. Oznaczanie względnej wydajności reakcji ninhydrynowej z poszczególnymi aminokwasami

Wydajność barwnego produktu reakcji poszczególnych aminokwasów z ninhydryną oznaczano względem L-leucyny, dla której wydajność przyjęto jako równą jedności. Sposób postępowania był następujący. Do roztworu danego aminokwasu o stężeniu 0,5 μM/ml i w ilości 0,2 ml, dodawano roztwór 2, odczynnik ninhydrynowy i wywoływano barwę sposobem podanym uprzednio. Odczyty ekstynkcji dokonywano przy filtrze zielonym, jedynie dla proliny przy filtrze niebieskim. Otrzymane wyniki ilustruje tab. 1.

4. Obliczanie stopnia odzysku aminokwasów z kolumny

Stopień odzysku poszczególnych aminokwasów wyliczano metodą podaną przez Krampitza i Müllera (1). Ekstynkcję próbek, które rozcieńczano mieszaniną izopropanol—woda w ilości większej niż 5 ml przeliczano na najmniejszy stopień rozcieńczenia. Tak np. jeśli barwny produkt rozcieńczano 10 ml, to jego ekstynkcję mnożono przez liczbę 1,67, $\left(\frac{2,4 + 10}{2,4 + 5}\right)$, a w przypadku, gdy dodano 15 ml mieszaniny rozcieńczającej, to jej ekstynkcję mnożono przez $\frac{17,4}{7,4} = 2,35$. Chcąc wyrazić ilość odzyskanego aminokwasu w μM leucyny korzystano z następującego wzoru:

$$\mu\text{M leucyny} = \frac{\Sigma E - E_{\text{śl}} \cdot n}{E_{\text{leuc.}} - E_{\text{śl}}} \quad (1)$$

ΣE = suma ekstynkcji wszystkich frakcji, tworzących wierzchołek („peak”) danego aminokwasu, przeliczonych na rozcieńczenie normalne (5 ml).

$E_{\text{śl.}}$ = wartość średnia ekstynkcji dla ślepej próby.

n = liczba pojedynczych frakcji danego wierzchołka.

$E_{\text{leuc.}}$ = ekstynkcja roztworu L-leucyny o stężeniu 1 $\mu\text{M/ml}$.

Celem przeliczenia wyników na mikromole danego aminokwasu, stężenia „leucynowe” otrzymane ze wzoru (1), mnożono przez faktor f , który wyliczano dzieląc wydajność produktu barwnego L-leucyny (1,00) przez liczbę, wyrażającą wydajność tego produktu dla danego aminokwasu (p. tab. 1).

$$\mu\text{M aminokwasu} = \mu\text{M leucyny} \cdot f \quad (2)$$

Tab. 1. Względne wydajności barwnego produktu reakcji aminokwasów z ninhydryną, prowadzonej w środowisku glikolu dwuetylenowego (Leucyna = 1,00)

Relative colour yields for the reaction of amino acids with ninhydrin in the medium of diethylene glycol (Leucine = 1)

L.p.	Aminokwas	Wydajność barwy	L.p.	Aminokwas	Wydajność barwy
1	Kwas asparaginowy	0,96	10	Metionina	1,00
2	Treonina	0,95	11	Leucyna	1,00
3	Seryna	0,93	12	Izoleucyna	1,00
4	Prolina	0,20	13	Tyrozyna	1,00
5	Cystyna	1,05	14	Fenylalanina	1,02
6	Glicyna	0,93	15	Histydyna	1,12
7	Alanina	0,96	16	Lizyna	1,11
8	Kwas glutaminowy	1,00	17	Arginina	1,05
9	Walina	0,96			

Poniżej podano przykład wyliczenia stopnia odzysku kwasu asparaginowego. Dane doświadczalne zestawiono w tab. 2. W kolumnie pierwszej znajdują się frakcje wycieku, zawierające kwas asparaginowy, wyeluowany z kolumny (od nr 116 do nr 123). W kolumnie drugiej, trzeciej i czwartej umieszczono wartości ekstynkcji dla poszczególnych frakcji wycieku o różnym stopniu rozcieńczenia. Kolumna piąta zawiera wartość ekstynkcji roztworu L-leucyny o stężeniu 0,5 $\mu\text{M/ml}$ przy rozcieńczeniu 15 ml mieszaniny izopropanol—woda. W tabeli następnej (nr 3) zsumowano wartości ekstynkcji poszczególnych frakcji wycieku o jednakowym stopniu rozcieńczenia oraz przeliczono je na rozcieńczenie normalne.

Tab. 2. Wyciąg z protokołu roboczego, dotyczącego wycieku, w którym znajduje się kwas asparaginowy

Data from the tentative report concerning the effluent with aspartic acid

Nr frakcji	Ekstynkcja dla różnych rozcieńczeń			Ekstynkcja 0,5 μ M/ml leucyny przy rozc. 15 ml	Aminokwas
	5 ml	10 ml	15 ml		
111	0,11			0,32	Kwas asparaginowy
112	0,11				
113	0,11				
114	0,10				
115	0,11				
116	0,12				
117	0,21				
118	0,41				
119		0,35			
120			0,51		
121		0,47			
122		0,23			
123	0,14				
124	0,10				
125	0,11				

Tab. 3. Suma wartości ekstynkcji dla różnych stopni rozcieńczeń
Total extinction values for different degrees of dilution

Stopień rozcieńczenia	Suma wartości ekstynkcji	Suma wartości ekstynkcji w przeliczeniu na rozcieńczenie normalne
5 ml	0,88	0,88
10 ml	1,05	1,75
15 ml	0,51	1,19
		$\Sigma E = 3,82$

Liczba frakcji wchodzących w skład wierzchołka kwasu asparaginowego wynosi 8, zatem $n = 8$. Ekstynkcja dla ślepej próby równa jest przeciętnie 0,11, a więc $E_{s1} = 0,11$. Wartość ekstynkcji roztworu L-leucyny o stężeniu 1 $\mu\text{M}/\text{ml}$ w przeliczeniu na rozcieńczenie normalne wynosi: $0,32 \cdot 2 \cdot 2,35 = 1,50$. Otrzymane wartości podstawiono do wzoru (1).

$$\mu\text{M leucyny} = \frac{3,82 - (0,11 \cdot 8)}{1,50 - 0,11} = 2,115$$

$$f = 1,00 : 0,96 = 1,04 \text{ zatem}$$

$$\mu\text{M kwasu asparaginowego} = 2,115 \cdot 1,04 = 2,120$$

Na kolumnę naniesiono 2,126 μM kwasu asparaginowego, a wyeluowano 2,120 μM , więc odzysk wyniósł 99,7%.

W przypadku niecałkowitego rozdziału aminokwasów stopień ich odzysku wyliczano korzystając ze wzorów podanych przez Moore'a i Steina (4):

$$A_1 = \frac{P_1 \cdot T}{F_1 \left(P_1 + \frac{V_2}{V_1} P_2 \right)} \quad (3)$$

$$A_2 = \frac{\frac{V_2}{V_1} \cdot P_2 \cdot T}{F_2 \left(P_1 + \frac{V_2}{V_1} P_2 \right)} \quad (4)$$

A_1, A_2 = ilości mikromoli aminokwasów niezupełnie rozdzielonych

P_1, P_2 = ilości mikromoli aminokwasów znajdujących się w szczytowych punktach dwóch sąsiednich „peaków”

V_1, V_2 = objętości wycieku, odpowiadające szczytowym punktom „peaków”

F_1, F_2 = względne wydajności barwnych produktów reakcji aminokwasów z ninhydriną

T = ilość mikromoli leucyny, wyliczona ze wzoru:

$$T = \frac{\Sigma E - E_{s1} \cdot n}{E_{\text{leuc.}} - E_{s1}}$$

ΣE = suma ekstynkcji dla obydwu aminokwasów.

Niżej podano przykład wyliczeń stopnia odzysku leucyny i izoleucyny, które rozdzieliły się niezupełnie. Liczba frakcji wycieku zawierającego leucynę i izoleucynę wynosiła 16, a więc $n = 16$.

$$\Sigma E = 4,11; \text{ zatem } t = 1,680 \mu\text{M}$$

$$P_1 = 0,209$$

$$F_1 = 1,00$$

$$V_1 = 320 \text{ ml}$$

$$P_2 = 0,100$$

$$F_2 = 1,00$$

$$V_2 = 330 \text{ ml}$$

Powyższe dane wstawiano kolejno do wzorów (3) i (4).

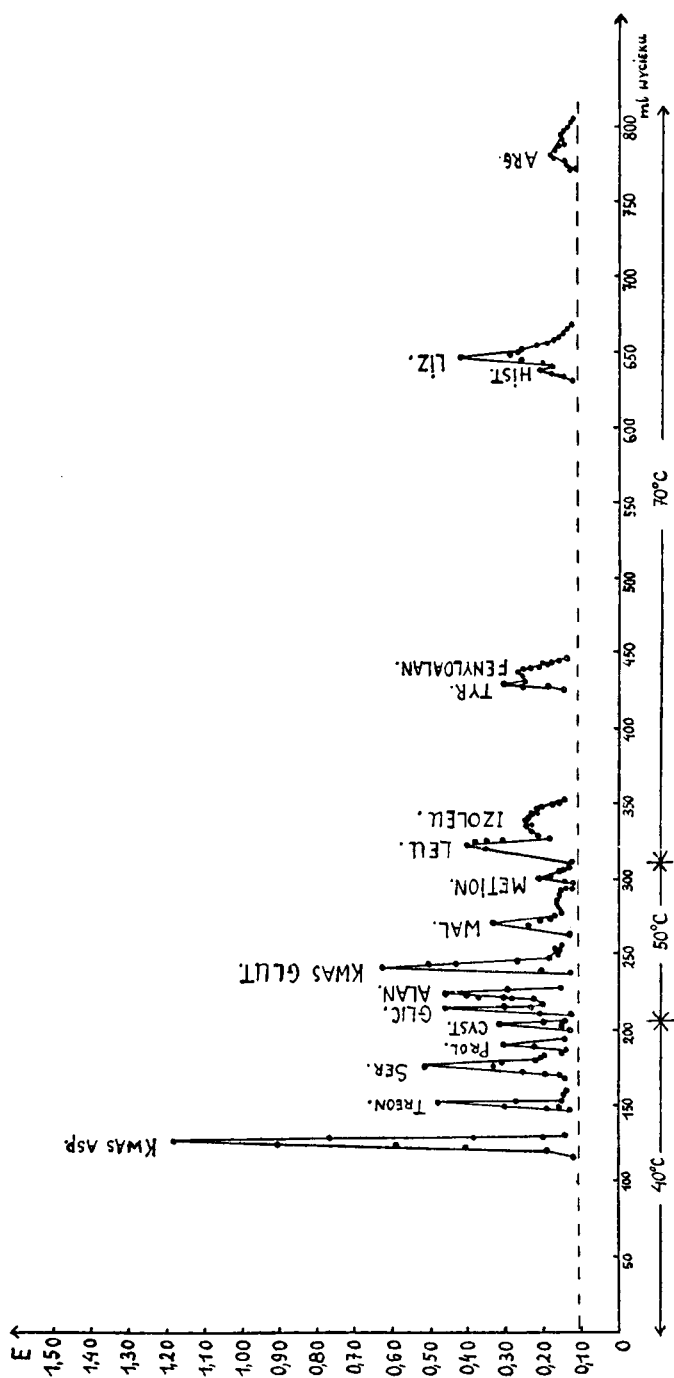
$$A_1 = \frac{P_1 \cdot T}{F_1 \left(P_1 + \frac{V_2}{V_1} P_2 \right)} = \frac{0,209 \cdot 1,680}{1,00 \left(0,209 + \frac{330}{320} \cdot 0,1 \right)} = 1,128$$

$$A_2 = \frac{\frac{V_2}{V_1} \cdot P_2 \cdot T}{F_2 \left(P_1 + \frac{V_2}{V_1} P_2 \right)} = \frac{\frac{330}{320} \cdot 0,1 \cdot 1,680}{1,00 \left(0,209 + \frac{330}{320} \cdot 0,1 \right)} = 0,554$$

Zatem leucyny wyeluowano $1,128 \mu\text{M}$, a izoleucyny $0,554 \mu\text{M}$. Na kolumnę naniesiono $1,096 \mu\text{M}$ leucyny i $0,548 \mu\text{M}$ izoleucyny, odzysk więc w procentach wynosi 103,0% dla leucyny i 101,0% dla izoleucyny. Stopień odzysku poszczególnych aminokwasów z kolumny chromatograficznej podaje tab. 4.

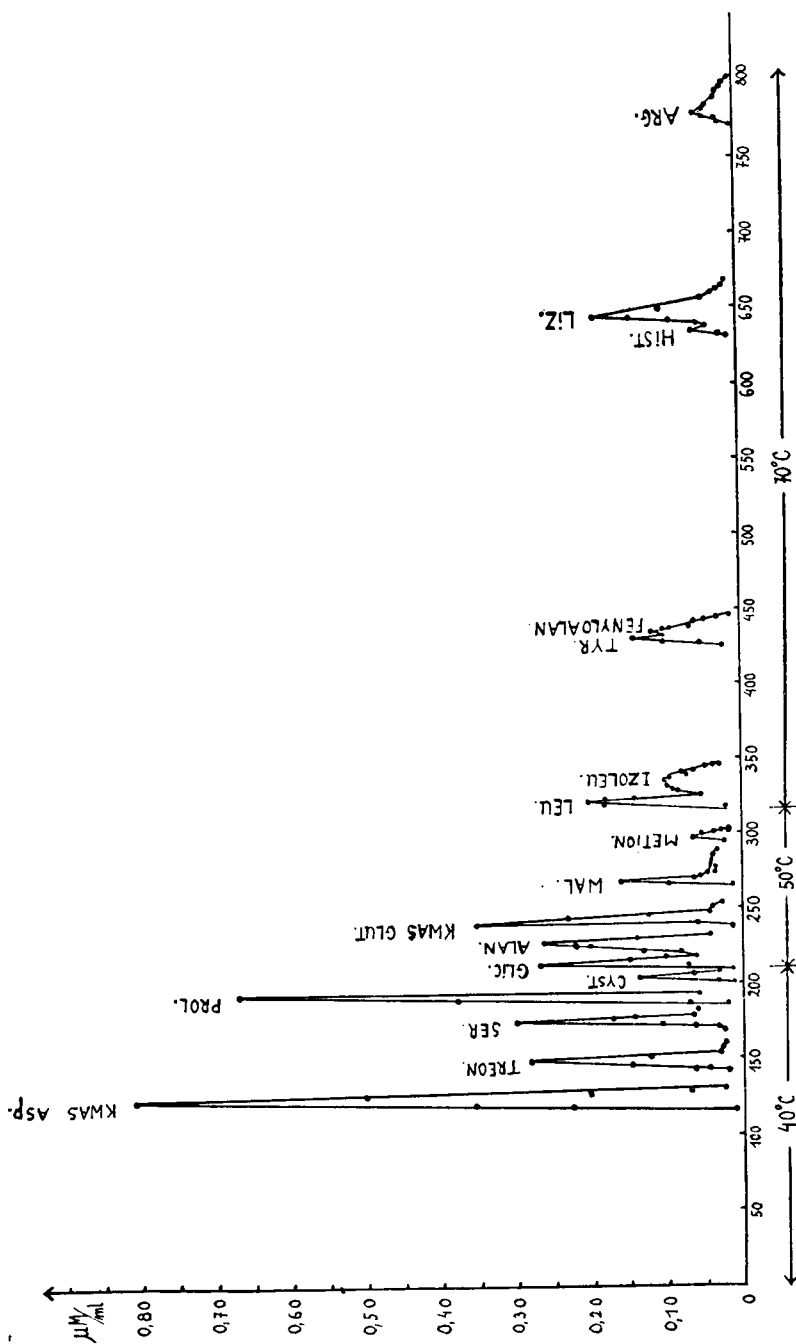
Tab. 4. Stopień odzysku aminokwasów z kolumny
Degree of the recovery of amino acids from the column

L.p.	Aminokwas	Oznaczenie			Średnio μM	Odzysk w %
		1	2	3		
1	Kwas asparag.	2,256	2,200	2,210	2,222	104,5
2	Treonina	0,763	0,745	0,760	0,756	98,0
3	Seryna	1,095	1,059	1,116	1,090	98,0
4	Prolina	1,145	1,179	1,363	1,229	103,2
5	Cystyna	0,266	0,261	0,271	0,266	94,0
6	Glicyna	0,662	0,691	0,747	0,700	105,3
7	Alanina	0,798	0,889	0,950	0,879	101,6
8	Kwas glutamin.	1,300	1,266	1,214	1,260	96,2
9	Walina	0,660	0,593	0,598	0,617	92,5
10	Metionina	0,175	0,179	0,183	0,179	68,6
11	Leucyna	1,128	1,121	1,138	1,129	103,0
12	Izoleucyna	0,554	0,561	0,554	0,553	101,0
13	Tyrozyna	0,627	0,602	0,607	0,612	94,5
14	Fenylalanina	0,531	0,508	0,497	0,512	98,6
15	Histydyna	0,229	0,330	0,140	0,233	99,0
16	Lizyna	0,808	0,827	0,828	0,821	79,0
17	Arginina	0,298	0,313	0,325	0,312	78,2



Ryc. 1. Rozdział aminokwasów w mieszaninie syntetycznej na kolumnie z kationitem K 26 W-L (zależność ekstynkcji od objętości wycieku)

Separation of amino acids in a synthetic mixture on the column with cation exchanger K 26 W-L (dependence of optical density on the volume of effluent)



Ryc. 2. Rozdział aminokwasów w mieszaninie syntetycznej na kolumnie z kationitem K 26 W-L (zależność stężenia aminokwasów od objętości)

Separation of amino acids in a synthetic mixture on the column with cation exchanger K 26 W-L (dependence of the concentration of amino acids on the volume of effluent)

Ekstynkcję frakcji wycieku w zależności od objętości eluatu przedstawiono na ryc. 1 (wartości ekstynkcji odczytane na fotokolorymetrze przeliczono na rozcieńczenie normalne). Ryc. 2 ilustruje zależność stężenia aminokwasów w poszczególnych frakcjach wycieku od objętości eluatu.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Metoda ilościowego oznaczania aminokwasów w wycieku z kolumny chromatograficznej musi odznaczać się bardzo dużą czułością i dostateczną reproduktywnością wyników. Zastosowana przez autora modyfikacja metody ninhydrynowej spełnia te warunki bardzo dobrze. Szczególnie korzystny wydaje się fakt, że wydajność reakcji prowadzonej w środowisku glikolu dwuetylenowego nie ulega istotnym zmianom w zakresie pH 4—9 (9). W metodach opisywanych w literaturze (3, 6, 12) największą wydajność reakcji ninhydrynowej uzyskiwano w roztworze o pH 5. Jeśli analizowana próbka wykazywała inny odczyn, wówczas doprowadzano jej pH do 5 przez dodanie kilku kropel kwasu solnego lub wodorotlenku sodu. W chromatografii kolumnowej, gdzie trzeba oznaczyć stężenie aminokwasów w kilkuset próbkach, było to kłopotliwe i czasochłonne. Nieco później (5) wyeliminowano tę dodatkową czynność w ten sposób, że do odczynnika ninhydrynowego dodawano bufor o dużej pojemności moderatorowej. Ujemną stroną tego postępowania było podwyższenie ekstynkcji ślepej próby.

W metodzie stosowanej przez autora dodawanie buforu okazało się rzeczą zbędną z uwagi na szeroki zakres pH, w jakim wydajność reakcji ninhydrynowej wykazywała maksymalną wartość. Dzięki temu ekstynkcja ślepej próby uległa znacznemu obniżeniu w porównaniu z metodami Moore'a i Steina oraz Trolla i Cannana. Przeprowadzono również próby oznaczania aminokwasów w środowisku glikolu dwuetylenowego, lecz bez udziału fenolu. Stwierdzono, że czułość reakcji ulegała wówczas nieznacznemu obniżeniu. Dodatnią stroną tego postępowania była nieco większa trwałość uzyskiwanego zabarwienia.

Jeśli chodzi o względne wydajności reakcji ninhydrynowej dla poszczególnych aminokwasów (tab. 1), to daje się zauważyć dość dużą zbieżność wyników. Jedynie dla proliny, histydyny i lizyny odchylenia są znacznie większe. Wynika z tego wniosek, że reakcja ninhydrynowa prowadzona w środowisku glikolu dwuetylenowego wykazuje jednakową wydajność dla większości aminokwasów. Otrzymane wyniki są w tym względzie bardziej zbliżone do metody Trolla i Cannana niż Steina i Moore'a.

Zastosowanie w naszej pracy sposobu obliczeń, podanego przez Krampitza i Müllera pozwoliło na wykreślenie krzywych elucji, które dają pogląd o ostrości uzyskanego rozdziału. Z wykresów na ryc. 1 i 2 widać, że z wyjątkiem aminokwasów izomerycznych, aromatycznych i zasadowych, rozdział jest zadowalający. Glicyna i alanina nie zawsze rozdzielają się nawet na kationitach polistyrenowych (8). Odzysk aminokwasów rozdzielonych niezupełnie można było wyliczyć, stosując wzory podane przez Moore'a i Steina (4). Stopień odzysku aminokwasów z kolumny można określić jako dostateczny z wyjątkiem metioniny, lizyny i argininy, które wyeluowano w ilościach nie przekraczających 80%.

Przegląd wyników z przeprowadzonych dotychczas badań pozwala wnioskować, że kationity krajowe K 26 W-L i MK-2 można stosować w analizie ilościowej aminokwasów. Otrzymywane wyniki są jednak daleko skromniejsze od tych, które uzyskuje się na żywicach polistyrenowych. Ujemną stroną rozdzielania aminokwasów na wymieniaczach fenolosulfonowych jest głównie długi czas trwania analizy (10 dni), podczas gdy elucja aminokwasów z jonitów monofunkcyjnych odbywa się w ciągu 2—3 dni.

Pani Doc. Dr Irenie Krzeczowskiej, Kierownikowi Katedry Chemii Ogólnej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie składam gorące podziękowanie za cenną pomoc i troskliwą opiekę w czasie wykonywania niniejszej pracy.

PIŚMIENNICTWO

1. Krampitz G., Müller R.: Z. f. Tierphysiol. Tierernähr. u. Futtermittelkunde, **13**, 114—128, 1958.
2. Meyer H.: Biochem. J. **67**, 333—340, 1957.
3. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. **176**, 367—388, 1948.
4. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. **192**, 663—681, 1951.
5. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. **211**, 907—913, 1954.
6. Rosen H.: Archiv. Biochem. Biophys. **67**, 10—15, 1957.
7. Schwerdfeger E.: J. of Chromatogr. **7**, 418—419, 1962.
8. Stegemann H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **319**, 87—101, 1960.
9. Szczepaniak St.: Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D, **19**, 303—310, 1964.
10. Troll W., Cannan R. K.: J. Biol. Chem. **200**, 803—811, 1953.
11. Wiewiórowski M., Przybylska J., Kociałkowski Z.: Roczn. Nauk Roln. **79**, 452—465, 1958.
12. Yemm E. W., Coking E. C.: Analyst **80**, 209—213, 1955.

Pracę otrzymano 10 IV 1965.

РЕЗЮМЕ

Автором описан метод количественного определения аминокислот после предварительного разделения на колонке с катионитом K 26 W-L.

Нингидриновая реакция была проведена в среде диэтиленгликола вместе с фенолом и изопропанолом (9).

При этом определены относительные выходы этой реакции для отдельных аминокислот, принимая во внимание, что выход L-лейцина равен 1.

Степень возраста аминокислот из колонки была удовлетворительной, за исключением метионина, лизина и аргинина, которые элюированы не больше, чем на 80%.

Рис. 1. Разделение синтетической смеси аминокислот на колонке с катионитом K-26 W-L (зависимость экстинкции от объема элюата).

Рис. 2. Разделение синтетической смеси аминокислот на колонке с катионитом K-26 W-L (зависимость концентрации аминокислот от объема элюата).

Табл. 1. Относительные выходы реакции аминокислот с нингидрином в среде диэтиленгликола (лейцин = 1,00).

Табл. 2. Выписка из рабочего протокола, которая относится к элюату содержащему аспарагиновую кислоту.

Табл. 3. Сумма значений экстинкции для различной степени разбавления.

Табл. 4. Степень возраста аминокислот из колонки.

SUMMARY

The method of quantitative determination of amino acids after the separation on the column with Polish cation exchanger K 26 W-L is described. The ninhydrin reaction was carried out in the medium of di-ethylene glycol, together with phenol and isopropyl alcohol (9). The relative colour yields for this reaction were determined for the individual amino acids (colour yield for L-leucine = 1). The degree of recovery of amino acids from the column was satisfactory, except for methionine, lysine and arginine. The recovery of these amino acids did not amount to as much as 80%.