

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Stanisław SZCZEPANIAK, Joanna ŁUKASIEWICZ

**Porównawcza ocena ilościowego oznaczania aminokwasów
w surowicy krwi metodą elucji barwnych plam z bibuły
i metodą fotometrii negatywów chromatogramów**

Сравнительная оценка количественного определения аминокислот сыворотки
крови методом элюции цветных пятен с бумаги и методом фотометрии
негативов хроматографии

Comparative Assessment of Amino Acid Determination in Blood Serum
by the Method of Elution of Coloured Spots from the Paper and by
the Method of Photometry Negatives

Otrzymywanie dokładnych i powtarzalnych wyników w analizie ilościowej aminokwasów, rozdzielonych na bibule, jest sprawą niełatwą, mimo dużej ilości metod i ich różnych modyfikacji (1, 6, 10, 11, 13, 22, 28, 30, 39, 40). Rezultaty otrzymywane przy pomocy metod chromatografii kolumnowej (4, 7, 14, 16, 23, 31, 34, 35, 36) są obciążone mniejszym błędem i odznaczają się lepszą powtarzalnością. Szczególnie daje się to zauważyć w metodach automatycznych (10, 21, 24, 31, 33). Ze względu na wysoki koszt aparatury pracującej automatycznie zalicza się ona do sporadycznych wyjątków w naszych pracowniach. Oznaczanie aminokwasów metodą chromatografii kolumnowej, opartej na kolektorze frakcji (34, 35, 36), jest uciążliwe i bardzo pracochłonne. Należy tu wywołać barwę i oznaczyć ekstynkcję w kilkuset próbkach eluatu. Metody oparte na chromatografii bibułowej odznaczają się dużą prostotą zarówno pod względem sprzętu, jak i wykonania. Tym tłumaczy się ich duża popularność w naszych pracowniach badawczych. Znane są różne sposoby oznaczania aminokwasów rozdzielonych na bibule. Do najczęściej stosowanych zaliczyć należy: 1) elucję barwnego produktu reakcji aminokwasów z ninhydriną (3, 6, 17), 2) ekstrakcję z bibuły aminokwasów nie wybarwionych i późniejsze wywoływanie barwy w roztworze na gorąco (5, 30) i 3) fotometrię negatywów chromatogramów (12, 18, 19, 20, 39). W dwu pierwszych metodach mierzy się absorpcję światła przez barwne roztwory, a w metodzie trzeciej chromatogram fotografuje się, po czym oznacza stopień przepuszczalności światła przez plamy aminokwasowe negatywu.

Celem naszej pracy jest porównanie wyników oznaczania aminokwasów w surowicy krwi metodą elucji barwnych plam z chromatogramu i metodą fotometrii negatywów.

MATERIAŁ I APARATURA

- 1) Surowica krwi w ilości 2—3 cm³,
- 2) aminokwasy f-my Nutritional Biochemical Corporation,
- 3) aparat fotograficzny „Exacta Varex — 2 A”,
- 4) spektrokolorymetr „Spekol”,
- 5) mikrofotometr Zeiss, Model III.

BADANIA WŁASNE

Przygotowanie surowicy do chromatografii

Surowicę odbiałczano i odtłuszczano stosując zmodyfikowaną przez nas technikę Awapary (2). Do 2 cm³ surowicy dodawano 2 cm³ wody, a następnie 36 cm³ etanolu. Po dokładnym wymieszaniu całość odstawiano na przeciąg pół godziny. Osad białka odwirowywano i przemywano etanolem. Do supernatantu dodawano 10 cm³ wody i 200 cm³ chloroformu. Połączone roztwory poddawano wytrząsaniu w rozdzielaczu i odstawiano na okres kilku godzin. Po dokładnym rozdzieleniu faz, warstwę wodną przenoszono do parownicy, a do warstwy chloroformowej dodawano jeszcze 10 ml wody, wstrząsano i po kilku godzinach rozdzielano. Połączone wodne warstwy odparowywano do suchości. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml wody i ten roztwór наносzono na bibułę.

Chromatograficzny rozdział

Na bibułę Whatman nr 3 MM ukształtowaną wg techniki Szczepaniaka i Krzeczowskiej (37, 38) наносzono wzrastające ilości, a mianowicie 1, 2, 3 i 4 mikropipetki mieszaniny wzorcowej, o składzie aminokwasowym zbliżonym do surowicy czterokrotnie zatężonej, oraz 3 mikropipetki odtłuszczonej i odbiałczonej surowicy. Ilości danego aminokwasu, znajdujące się w poszczególnych miejscach naniesienia wzorca zamieszczono w tab. 1. Objętość mikropipetki wynosiła 34 μl.

Chromatogramy w formie ściętego, odwróconego stożka rozwijano w układzie rozpuszczalników: n-butanol — kwas octowy — woda (4:1:1). Proces rozwijania przeprowadzano 3-krotnie, każdorazowo w ciągu 42 godzin. Chromatogramy suszono na powietrzu i wywoływało przez zanurzenie w odczynniku ninhydrynowym wg Barrouliera (3), zawierającym domieszkę soli kadmu. Stosowano 0,5% roztwór ninhydryny, natomiast w metodzie oryginalnej stężenie ninhydryny równe było 2%. Wstępne próby wykazały niecelowość stosowania tak stężonego roztworu. Zawsze stosowano odczynnik ninhydrynowy świeżo sporządzony. Wywoływanie barwy odbywało się w temperaturze pokojowej i trwało 24 godziny. Jeden z chromatogramów otrzymanych tą metodą ilustruje ryc. 1.

Oznaczanie ilościowe

a) metoda fotometrii negatywów.

Różowe plamy kompleksów kadmowych barwnego produktu reakcji aminokwasów z ninhydryną obrysowywano ołówkiem i fotografowano. Stosowano mikrofilm pozytywowy produkcji polskiej. Czas ekspozycji wynosił 2 sek., a optymalna

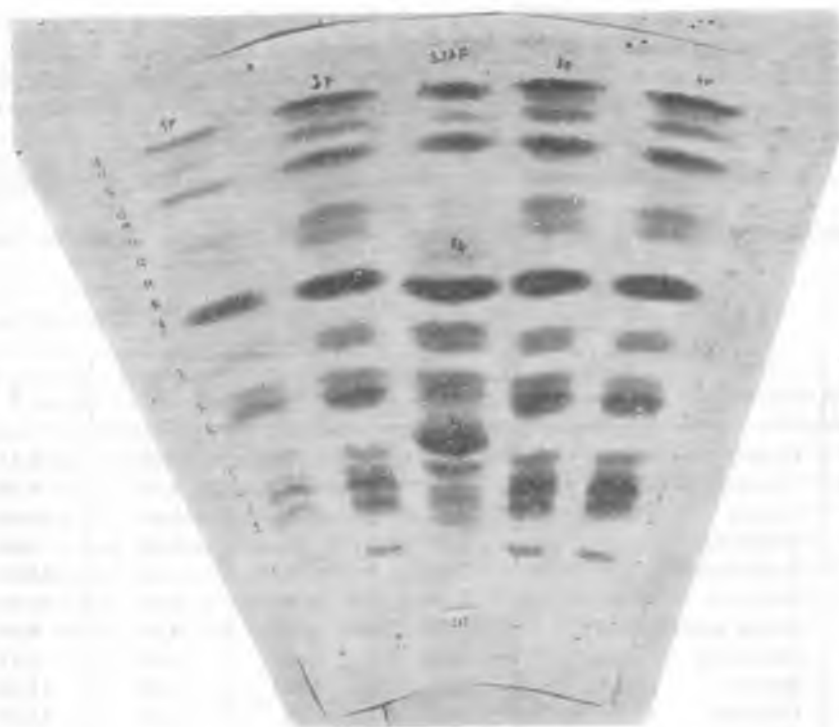
wielkość przesłony 5,6 w aparacie „Exacta Varex-2A” z obiektywem „Biotar”. Chromatogram fotografowano z takiej odległości, by negatyw zajmował możliwie najmniej miejsca na klatce filmu i jednocześnie odznaczał się dobrą ostrością. Optymalna odległość chromatogramu od obiektywu wynosiła 2,0–2,5 m. Stosowano wywoływacz uniwersalny — czas 1 minuta.

Tab. 1. Ilości aminokwasów w μg nanoszonych na bibułę celem sporządzenia krzywych kalibracji

Quantities of amino acids in μg placed on chromatographic paper to trace calibration curves

Lp.	Aminokwas	μg aminokwasu			
		liczba pipetek			
		1	2	3	4
1	Cystyna	1,36	2,72	4,08	5,44
2	Ornityna	2,26	4,52	6,78	9,04
3	Lizyna	4,16	8,32	12,48	16,64
4	Histydyna	1,38	2,76	4,14	5,52
5	Asparagina	3,02	6,04	9,06	12,08
6	Arginina	3,15	6,30	9,45	12,60
7	Kwas asparaginowy	1,50	3,00	4,50	6,00
8	Cytrulina	1,98	3,96	5,94	7,92
9	Seryna	2,94	5,88	8,82	11,76
10	Glicyna	3,67	7,34	11,01	14,68
11	Kwas glutaminowy	1,12	2,24	3,36	4,48
12	Treonina	2,50	5,00	7,50	10,00
13	α -Alanina	9,35	18,70	28,05	37,40
14	Prolina	2,52	5,04	7,56	10,08
15	Tyrozyna	4,52	9,04	13,56	18,08
16	Kwas α -NH ₂ masłowy	1,34	2,68	4,02	5,36
17	Tryptofan	6,80	13,60	20,40	27,20
18	Metionina	1,00	2,00	3,00	4,00
19	Walina	3,98	7,96	11,94	15,92
20	Fenylalanina	4,59	9,18	13,77	18,36
21	Izoleucyna	1,47	2,94	4,41	5,88
22	Leucyna	4,49	8,98	13,47	17,96

Pomiary przepuszczalności światła wykonywano za pomocą Mikrofotometru Zeiss, Model III. Przesuwając stolikiem, na którym spoczywał film między dwoma płytkami szklanymi, wyszukiwano miejsce w danej plamce wykazujące największą przepuszczalność światła i rejestrowano wychylenie galwanometru na skali „D”. Najpierw wyszukiwano miejsce o maksymalnej transmisji światła dla plamki o największym stężeniu danego aminokwasu. Regulując za pomocą szczeliny i przysłon ilość padającego na fotoogniwo światła, nastawiano wychylenie galwanometru na określoną liczbę podziałek skali „D”, najczęściej na 800. Następnie mierzono wychylenie galwanometru w miejscach o maksymalnej przepuszczalności dla pozostałych plamek danego aminokwasu. Z otrzymanych danych kreślono krzywe kalibracji, podające zależność transmisji światła od ilości aminokwasu, które przedstawiono na ryc. 2.



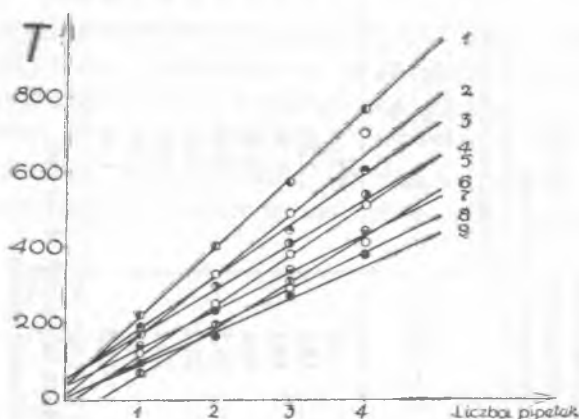
Ryc. 1. Chromatograficzny rozdział aminokwasów surowicy krwi techniką ściętego, odwróconego stożka; 1p, 2p, 3p, 4p — wzorce, S27F — surowica, 1 — cys, 2 — orn, 3 — liz, 4 — asp-NH₂ + his, 5 — arg, 6 — asp + cytr + ser, 7 — gli, 8 — glu + tre, 9 — α-ala, 10 — pro, 11 — tyr, 12 — try, 13 — αNH₂masł, 14 — met, 15 — wal, 16 — fenal, 17 — ileu, 18 — leu, x₁ i x₂ — nieznane peptydy

Chromatographic separation of amino acids in blood serum by the technique of truncated inverted cone; 1p, 2p, 3p, 4p — standards, S27F — serum, 1 — cys, 2 — orn, 3 — lys, 4 — asp NH₂ + his, 5 — arg, 6 — asp + citr + ser, 7 — gly, 8 — glu + thre, 9 — α-ala, 10 — pro, 11 — tyr, 12 — try, 13 — αNH₂ but, 14 — met, 15 — val, 16 — phenal, 17 — ileu, 18 — leu, x₁ and x₂ — unknown peptides

b) Metoda elucyjna.

Po sfotografowaniu chromatogramu barwne plamki wycinano i krojono na wąskie paseczki. Do pociętych skrawków, znajdujących się w wysokich próbkach dodawano 5 ml 70% metanolu. Te same czynności wykonywano ze ślepą próbą wyciętą z tego samego chromatogramu. Probówki zakorkowywano, wstrząsano i odstawiano na przeciąg około 2 godzin. Po ponownym wytrząsaniu przystępowano do pomiarów ekstynkcji przy pomocy spektrokolorymetru „Spekol”. Absorbencję mierzono dla długości fali 510 nm, w kuwetach o grubości warstwy 1 cm. Krzywe wzorcowe ilustrujące zależność ekstynkcji od stężenia aminokwasu podano na ryc. 3. Z krzywych kalibracji, otrzymanych przy pomocy obydwu metod wyznaczano stężenie aminokwasu w surowicy. Przeprowadzono 5 równoległych oznaczeń tej samej surowicy i otrzymane wyniki opracowano statystycznie. Uzyskane rezultaty zesta-

wiono w tab. 2. Do oznaczeń porównawczych brano tylko te plamy aminokwasowe, które były dobrze odgraniczone od sąsiadujących z nimi innych plam. Aminokwasy występujące w surowicy w niskich stężeniach również nie były uwzględniane.



Ryc. 2. Krzywe kalibracji aminokwasów otrzymane metodą fotometrii negatywów chromatogramów; 1 — ileu + leu, 2 — met + wal, 3 — α -ala, 4 — liz, 5 — gli, 6 — fenal, 7 — orn, 8 — arg, 9 — glu + tre

Calibration curves of amino acids obtained by the photometry of chromatogram negatives; 1 — ileu + leu, 2 — met + val, 3 — α -ala, 4 — lys, 5 — gly, 6 — phenal, 7 — orn, 8 — arg., 9 — glu + thre

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W mieszaninie wzorcowej, zawierającej 22 aminokwasy uzyskiwano 18 plam. W jednej plamie zawsze znajdowały się: kwas asparaginowy, cytrulina i seryna. Natomiast takie pary aminokwasów, jak histydyna-asparagina, kwas glutaminowy-treonina i tyrozyna-tryptofan, na niektórych chromatogramach wędrowały razem, a na innych rozdzielały się częściowo. W surowicy nigdy nie udawało się rozdzielić metioniny od waliny oraz leucyny od izoleucyny, mimo że w mieszaninach wzorcowych pary te zawsze ulegały rozdzielaniu. Dodatkową trudność przy oznaczaniu aminokwasów w surowicy stanowi występowanie na chromatogramach 2 plam peptydowych. Jedna z nich ma taki sam współczynnik R_f jak zespołowa plama: asp-cytr-ser (plama x_1), a druga plama (x_2) lokowała się zawsze w miejscu tyrozyny i tryptofanu.

Analizując krzywe kalibracji można zauważyć, że w przypadku metody elucyjnej (ryc. 3) wszystkie cztery punkty leżą na prostej dla wszystkich aminokwasów z wyjątkiem glicyny, dla której punkt ostatni wyraźnie odbiega od prostoliniowej zależności. W metodzie prześwietlania negatywów sprawa wykreślenia właściwej krzywej wzorcowej jest

Tab. 2. Statystyczna ocena wyników oznaczania aminokwasów w surowicy krwi metodą elucyjną i fotometrii negatywów chromatogramów
 Statistical evaluation of the results of amino acid determination in blood serum by the elution method and by the photometry of chromatogram negatives

Lp.	Nazwa aminokwasu	Metoda elucyjna			Metoda negatywowa		
		$\bar{x} = (\mu\text{g/ml})$	$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$	$\mu = \pm ts$	$\bar{x} = (\mu\text{g/ml})$	$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n(n-1)}}$	$\mu = \pm ts$
1	Ornityna	7,3	0,05	7,3±0,14	4,8	1,04	4,8±2,89
2	Lizyna	15,6	0,45	15,6±1,25	10,1	1,12	10,1±3,11
3	Arginina	19,8	0,60	19,8±1,68	19,1	1,70	19,1±4,72
4	Glicyna	19,4	0,96	19,4±2,66	19,1	1,48	19,1±4,11
5	Kw. glut. + treonina	32,5	0,52	32,5±1,45	35,3	2,14	35,3±5,95
6	α -Alanina	48,4	2,43	48,4±6,74	53,7	3,33	53,7±9,26
7	Metionina + walina	26,5	0,43	26,5±1,21	22,4	1,94	22,4±5,38
8	Fenylalanina	16,3	0,06	16,3±0,18	14,1	1,20	14,1±3,34
9	Izoleucyna + leucyna	29,2	0,04	29,2±0,12	22,6	1,33	22,6±3,68

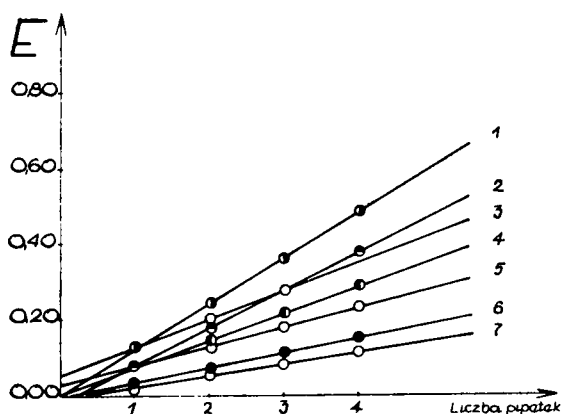
$\bar{x}$ — wartość średnia z 5 oznaczeń w $\mu\text{g/cm}^3$ surowicy (average of 5 determinations in $\mu\text{g/cm}^3$ of serum)

$\bar{s}$ — odchylenie standardowe średniej arytmetycznej (standard deviation of arithmetic mean)

$\mu = \bar{x} \pm ts$ — przedział ufności średniej arytmetycznej (confidence interval of arithmetic mean)

niemałym problemem. Jak widać z ryc. 2, wszystkie 4 punkty leżą na prostej tylko dla trzech plam, a mianowicie dla ornityny, fenyloalaniny i izoleucyny + leucyny.

Analiza danych statystycznych zawartych w tab. 2 wskazuje, że wartości średnie ($\bar{x}$) stężeń aminokwasów w surowicy, otrzymane przy pomocy porównywanych metod wyraźnie nie odbiegają od siebie z wyjątkiem ornityny, lizyny i izoleucyny + leucyny. Natomiast odchylenia standardowe średniej arytmetycznej ($\bar{s}$) dla wszystkich aminokwasów w metodzie elucyjnej są znacznie niższe niż w metodzie negatywowej, co



Ryc. 3. Krzywe kalibracji aminokwasów otrzymane metodą elucyjną; 1 — α -ala, 2 — ileu + leu, 3 — gli, 4 — glu + tre, 5 — met + val, 6 — liz, 7 — orn, arg i fenal
Calibration curves of amino acids obtained by the elution method; 1 — α -ala, 2 — ileu + leu, 3 — gly, 4 — glu + thre, 5 — met + val, 6 — lys, 7 — orn, arg and phenal

oczywiście wpływa korzystnie na przedziały ufności dla metody elucyjnej. Otrzymane wyniki świadczą, że metoda prześwietlania negatywów wymaga wykonania większej liczby oznaczeń, aby pod względem precyzji dorównać metodzie elucyjnej. Wydaje się, że główną tego przyczyną jest niemożliwość przepuszczenia światła przez całą powierzchnię plamki, lecz tylko przez jej mały wycinek. Zmniejszenie wymiarów obrazu chromatogramu do 1/4 klatki (20) zwiększa precyzję oznaczeń, lecz nie w takim stopniu, by wiązka świetlna przechodziła przez całą plamę. Drugim ujemnym czynnikiem w metodzie negatywowej jest to, że wiązka świetlna ma kształt regularny, prostokątny, natomiast plamki są mniej lub więcej nieregularne, postrzępione. Z tych względów pomiar transmisji światła trzeba ograniczyć do miejsc o największej przepuszczalności, co powoduje zmniejszenie dokładności metody i czyni ją bardziej uciążliwą i pracochłonną. Wyszukiwanie miejsc o maksymalnej

przepuszczalności wymaga nieco czasu. Tak np. odczytanie wyników, dla chromatogramu, zawierającego 4 wzorce i jedną próbkę surowicy pochłania 2—3 godz., nie wliczając w to justaryzacji mikrofotometru. Czas potrzebny na odczytanie ekstynkcji roztworów, uzyskanych z tego samego chromatogramu wynosi około 45 minut. Oczywiście należy tu doliczyć czas wycinania plamek i dolewania metanolu. Niewątpliwą zaletą metody prześwietlania negatywów jest fakt pozostawiania w stanie nienaruszonym oryginalnego chromatogramu, który może posłużyć do badań uzupełniających.

Pragniemy tu podkreślić, że czyniliśmy próby oznaczania aminokwasów metodą ekstrakcji tych związków z bibuły niewywołanej (30) i następnym wywołaniu barwy w roztworze. Pozytywnych wyników nie otrzymaliśmy. Nasze doświadczenia wykazują, że ta metoda posiada niewielką przydatność z dwu powodów. Przede wszystkim duże trudności przedstawia uwidocznienie miejsc zajętych przez poszczególne aminokwasy na bibule. Do tego celu stosuje się różne metody, a mianowicie: a) fluorescencję w świetle UV (15, 26, 27), b) wstępne traktowanie bibuły rozcieńczonym roztworem ninhydryny (25) i c) wnioskowanie o położeniu plam na całym chromatogramie wg ich lokalizacji na paskach skrajnych, wywołanych ninhydryną (9). Doświadczenie własne, jak również dane literaturowe wskazują, że czułość testu fluorescencyjnego jest znacznie niższa niż ninhydrynowego (26, 27). Nawet uprzednie traktowanie bibuły roztworem ksylozy (15) wg naszych doświadczeń nie powiększa intensywności świecenia plam w świetle UV. Również nasycanie bibuły odczynnikami Folina (32) wzmacnia fluorescencję tylko niektórych aminokwasów (26). We wszystkich sposobach wykonania testu fluorescencyjnego niezbędne jest ogrzewanie chromatogramu w temp. 100—110°C, co może prowadzić do rozkładania się niektórych aminokwasów. Uwidacznianie położenia aminokwasów za pomocą rozcieńczonej ninhydryny (25) wg naszych prób nie daje zadowalających wyników.

Najbardziej mylne wnioski co do lokalizacji poszczególnych aminokwasów można wysnuć stosując sposób trzeci. Nasze doświadczenia wykazują, że ten sam aminokwas znajduje się bardzo często na różnej wysokości chromatogramu w zależności od miejsca nakroplenia. Stwierdziliśmy również, że aminokwasy surowicy zawsze wędrowały nieco wolniej niż aminokwasy wzorcowe. Szczególnie dotyczy to aminokwasów o niższych współczynnikach R_f .

Następną sprawą, dostarczającą niemało kłopotu w metodzie ekstrakcji aminokwasów z chromatogramu niewywołanego, jest sprawa ślepej próby. Dane literaturowe (29) oraz badania własne wskazują na bardzo wysokie wartości ślepej próby w tym postępowaniu. Jest to spowodowane

wane znaczną zawartością w bibule amoniaku, związanych aminokwasów i innych substancji ninhydryno-pozytywnych. Nasze próby wykazały, że uprzednie przemywanie bibuły 1% alkoholowym roztworem KOH (5) nie zmniejsza ślepej próby w dostatecznym stopniu. W jakiej mierze bibuła jest zanieczyszczona związkami ninhydryno-pozytywnymi najlepiej świadczy fakt uzyskiwania przez nas ślepych prób o wartościach ekstynkcji nie mniejszych od tych, jakie dawały aminokwasy wzorcowe o niższych stężeniach.

WNIOSKI

1. Oznaczanie aminokwasów w surowicy krwi metodą elucji barwnych plam z chromatogramów bibułowych cechuje się większą precyzją, niż przy pomocy prześwietlania negatywów chromatogramów.

2. Większy rozrzut wyników w metodzie fotometrii negatywów jest spowodowany głównie brakiem możliwości pomiaru transmisji światła przez całą powierzchnię plamy.

3. Metoda elucji barwnych plam daje lepsze wyniki w porównaniu z metodą ekstrakcji aminokwasów z chromatogramu niewywołanego i późniejszego wywoływania barwy w roztworze.

PIŚMIENNICTWO

1. Atachanow E. I., Charafian A. M.: *Lab. Delo*, 7, 13—18, 1961.
2. Awapara J.: *Arch. Biochem.* 19, 172—173, 1948.
3. Barroulier J.: *Naturwiss.* 42, 416—418, 1955.
4. Bober S., Kruze D., Dąbrowa R., Iwańska J., Skrzypczyk E.: *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 32, 443—454, 1962.
5. Boissonas R. A.: *Helv. Chim. Acta* 33, 1975, 1950.
6. Fischer F. G., Dorfel H.: *Biochem. Z.* 324, 544—566, 1953.
7. Gerok W.: *Klin. Wschr.* 38, 1212—1215, 1960.
8. Hamilton P. B., Anderson A. A.: *Anal. Chem.* 31, 1504—1512, 1959.
9. Hrapia H.: *Einführung in die Chromatographie*. Akademie Verlag, Berlin 1969, 134.
10. Jirgl V.: *Clin. Chem.* 3, 154—155, 1957.
11. Janicki J., Kowalczyk J., Warchalewski J.: *Chem. Anal.* 12, 115, 1967.
12. Keil B.: *Chem. Listy*, 18, 725—734, 1954.
13. Knauff H. G., Dieterle P., Zickgraf H.: *Z. Physiol. Chem.* 316, 186—198, 1959.
14. Knauff H. G., Schabert P.: *Klin. Wschr.*, 38, 1206—1212, 1960.
15. Kofranyj E.: *Z. Physiol. Chem.* 299, 129—138, 1955.
16. Krampitz G., Müller R.: *Z. f. Tierernährung und Futtermittelkunde*, 13, 114—128, 1958.

17. Krzeczowska I., Iskierko J., Klimek J.: *Farm. Polsk.* **15**, 35—39, 1959.
18. Krzeczowska I., Burzyński S., Czerniak Z.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **21**, 125—134, 1966.
19. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D*, **21**, 313—322, 1966.
20. Krzeczowska I., Czerniak Z., Burzyński S.: *Pol. Arch. Med. Wewn.* **41**, 361—368, 1968.
21. Matthias W., Wagner J.: *J. Chromatog.* **26**, 41—47, 1967.
22. Mc Menamy R. H., Lund Ch. C., Onley J. L.: *Clin. Invest.* **26**, 1672—1679, 1957.
23. Moore S., Stein W. H.: *J. Biol. Chem.* **211**, 893—906, 1954.
24. Müller G., Jürgens P.: *Z. Klin. Chem.* **3**, 57—59, 1965.
25. Naftalin L.: *Nature*, **161**, 763—764, 1948.
26. Opieńska-Blauth J., Sanecka M., Chareziński M.: *J. Chromatog.* **3**, 415—425, 1960.
27. Phillips D. M. P.: *Nature*, **161**, 53—54, 1948.
28. Pisi E., Barbara L.: *Arch. Pathol. Clin. Med.* **36**, 3—10, 1959.
29. Schöenberg H.: *Klin. Wschr.* **34**, 269—272, 1956.
30. Schwerdtfeger E.: *Angew. Chem.* **70**, 188—189, 1958.
31. Schwerdtfeger E.: *Z. Lebensmittel-Untersuch. und Forsch.* **137**, 143—149, 1968.
32. Shore V. G., Pardee A. B.: *Anal. Chem.* **28**, 1479—1483, 1956.
33. Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.: *Anal. Chem.* **30**, 1190—1205, 1958.
34. Stegeman H.: *Z. Physiol. Chem.* **319**, 87—101, 1960.
35. Stein W. H., Moore S.: *J. Biol. Chem.* **211**, 915—926, 1954.
36. Szczepaniak S.: *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sec. D* **20**, 159—170, 1965.
37. Szczepaniak S., Krzeczowska I.: *Chem. Anal.* **11**, 1197—1202, 1966.
38. Szczepaniak S., Krzeczowska I., Nowicka E.: *Chem. Anal.* **13**, 155—158, 1968.
39. Szoke S., Szalai L.: *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* **12**, 295—297, 1957.
40. Walker D. G., Prasad A. S., Sadvich F.: *J. Lab. Clin. Med.* **59**, 110—117, 1962.
41. Wierzchowski P., Janczarska I., Kruze D.: *Acta Biochim. Polon.* **9**, 343—349, 1962.

Otrzymano 29 X 1969.

РЕЗЮМЕ

Провели сравнительные исследования точного определения аминокислот в сыворотке крови двумя методами: 1) метод элюции цветных пятен с бумаги и колориметрирование и 2) метод просвечивания негативов хроматограмм. Статистическая оценка полученных результатов показала, что первый метод является точнее. Рассматривали причины меньшей точности метода фотометрии негативов хроматограмм.

SUMMARY

The paper describes comparative investigations on the precision of amino acid determination in blood serum by the use of two methods: 1) elution of coloured spots from the paper and colorimetric analysis of coloured solutions, and 2) photometry of chromatogram negatives. Statistical evaluation of the obtained results showed the higher precision of the first method. The reasons for a smaller precision of the method of photometry negatives were discussed.

