

ANNALES  
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE - SKŁODOWSKA  
LUBLIN—POLONIA

VOL. XXI, 13

SECTIO D

1966

---

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

Irena KRZECZKOWSKA, Stanisław BURZYŃSKI,  
Zbigniew CZERNIAK

**Oznaczanie ilościowe aminokwasów przy zastosowaniu fotometrii  
negatywów chromatogramów (I)**

Quantitative Determination of Amino Acids Using Photometry of Negative  
Printed Chromatograms

Jednym z ważniejszych problemów współczesnej chemii analitycznej stało się opracowanie dokładnej i prostej metody ilościowego oznaczania aminokwasów. Metoda taka mogłaby znaleźć między innymi duże zastosowanie w klinice w rutynowych badaniach poziomu aminokwasów w surowicy krwi i w moczu. Niestety, w dotychczasowych doniesieniach na ten temat znajduje się często wyniki niedokładne i sprzeczne ze sobą, co powoduje, że każdy autor zmuszony jest opracowywać dla swojej metody nowe normy poziomu aminokwasów w płynach ustrojowych fizjologicznych i patologicznych (3).

Stosunkowo najprostsze i najczulsze są metody oparte na chromatografii bibułowej, a wśród nich elucyjne i densytometryczne. Niektórzy badacze oznaczają ilości aminokwasów na podstawie różnic w absorpcji światła przez eluowany z chromatogramów barwnik, powstały w reakcji aminokwasów z ninhydriną (13). Inni, np. Fowden (6) przeprowadzają reakcję z ninhydriną w roztworze, po elucji aminokwasów z bibuły, po uprzednim oznaczeniu ich położenia przy pomocy promieni ultrafioletowych. Jeszcze inni, jak Woiod (17) oraz Vincent (15), przyjęli za podstawę do obliczeń określenie ilości kompleksów miedziowo-aminokwasowych przy pomocy fotometrii, jodometrii ewentualnie metody wprowadzania miedzi znaczonej  $\text{Cu}^{64}$ .

Badacze oznaczający aminokwasy przy pomocy densytometru opierali się albo na różnicach w powierzchni plam, albo na absorpcji światła przez plamy (1, 7). Block (1), posługując się mierzaniem powierzchni ograniczonych przez krzywą otrzymaną na podstawie odczytów densytometru, uzyskał wyniki w zasadzie mało różniące się od metody bezpośredniego mierzenia powierzchni (4, 5, 8).

Prostsze od wyżej wymienionego jest oznaczanie ilości aminokwasów na podstawie maksymalnej absorpcji światła przez plamy. Metoda ta, wprowadzona przez Blocka (2) obciążona była dużym błędem (około 10%). Po pewnych modyfikacjach McFarrenowi (9) oraz Miettinenowi (11) udało się znacznie zwiększyć

dokładność, jednak błąd pozostawał nadal dość duży. Prawdopodobnie wadą tych metod była zła przezroczystość bibuły oraz nieostre zarysy plam. Autorzy dla zwiększenia przezroczystości przeważnie nasączali bibułę bromonaftolem i parafiną, co jednak nie dawało dobrych wyników. Wreszcie Mykołajewycz (12) zastosował dla oznaczania ilościowego aminokwasów pomiar natężenia światła przechodzącego przez negatyw chromatogramu. Podana przez niego metoda również nie jest zbyt dokładna, a błąd uzyskiwanych wyników wynosi około 5%. Ponadto urządzenia stosowane przez tego autora są bardzo mało precyzyjne i niewygodne w użyciu, a wykonanie pomiaru pochłania dużo czasu, ponieważ należy dokonać około dziesięciu odczytów. Wymienione wady uniemożliwiają zastosowanie powyższej metody do seryjnych badań klinicznych materiału biologicznego, co skłoniło nas do podjęcia próby opracowania innej metody ilościowego oznaczania aminokwasów, która byłaby dokładniejsza i praktyczniejsza w użyciu. Opracowana przez nas niżej podana metoda opiera się na prawie Lamberta—Beera, pozwala ona na stosunkowo szybkie i dokładne oznaczenie aminokwasów.

#### APARATY, MATERIAŁY, METODY

Do badań zastosowano mikrofotometr: Schnellphotometer II C. Zeiss (Jena). Doświadczenia wykonywano na bibule chromatograficznej Whatman N 3. Standardowe roztwory sporządzono z aminokwasów; 1) d,l-lizyny chlorowoderek — "B. D. H." Anglia, 2) d,l-kwas glutaminowy — "Fluka" Szwajcaria, i 3) d,l-leucyna — "B. D. H." Anglia. Mieszanki aminokwasów rozdzielano przy pomocy chromatografii na bibule, stosując technikę wstępującą wg Williamsa i Kirby (16), przy użyciu jako rozpuszczalnika fazę Patridge'a: n-butanol — kwas octowy (lodowaty) — woda w stosunku objętościowym 4:1:1. Chromatogramy wywoływano w temperaturze pokojowej, 0,2% acetonowym roztworem ninhydryny i (po uzyskaniu wyraźnych plam po ok. 4 godz.) fotografowano je na filmie małoobrazkowym. Do fotografii używano mikrofilmy firmy „Foton”. Uzyskane negatywy chromatogramów aminokwasów przesuwano pod obiektywem mikrofotometru (Schnellphotometer II — Zeiss), odczytując dla każdego aminokwasu największe natężenie światła przechodzącego przez plamę i przez tło bibuły obok plamy. Na podstawie odczytów sporządzono dla każdego aminokwasu wykresy, przy których pomocy obliczono ilości w  $\mu\text{g}$ .

#### BADANIA WŁASNE

Na arkuszach bibuły Whatman N 3 o wymiarach  $28 \times 42$  cm rozmieszczano dziewięć linii startowych o długości 25 mm każda, odległych od siebie o 25 mm i 30 mm od brzegu arkusza. Na pola startowe наносzono od 0,1 do 0,001 m roztwory trzech aminokwasów: lizyny, kwasu glutaminowego i leucyny w takich ilościach, że na jedno pole przypadają od 1  $\mu\text{g}$  do 100  $\mu\text{g}$  poszczególnych aminokwasów. Chromatogramy rozwijano w rozpuszczalniku n-butanol — kwas octowy lodowaty — woda w stosunku objętościowym 4:1:1 na drodze jednokierunkowej chromatografii wstępującej. Rozpuszczalnik przepuszczano dwukrotnie. Po dwukrotnym rozwinięciu chromatogramy suszono w temperaturze pokojowej i wywoływano przez zanurzenie w 0,2% acetonowym roztworze ninhydryny.

Uzyskane w ten sposób chromatogramy fotografowano (po upływie czterech godzin od chwili wywołania). Używano mikrofilmu negatywowego firmy „Foton”. W czasie wykonywania zdjęcia zwracano szczególną uwagę na równomierne oświetlenie fotografowanego arkusza, co ma duże znaczenie dla otrzymania jednakowego tła na całej klatce filmu. Dla kontroli oświetlenia arkusza bibuły można zastosować światłomierz. W praktyce jednak uzyskanie jednakowego tła dla całej klatki okazało się niemożliwe. Dlatego przy opracowywaniu wyników uwzględniano wartość tła osobno przy każdej plamie.

W opisywanej metodzie używano mikrofilmów ze względu na uzyskiwanie bardziej ostrych zarysów plam niż na filmach innych rodzajów. Poza tym z uwagi na stosunkowo duże powiększenie plam przez układ optyczny „Schnellphotometru” (25 ×) ważne jest, aby emulsja filmu była drobnoziarnista. Warunek ten spełnia właśnie mikrofilm. Film umieszczano na stoliku „Schnellphotometru” na drodze wiązki światła. Przesłonę ustawiano tak, by wysokość szczeliny, na którą pada wiązka światła nie przekraczała szerokości plamy. Szerokość szczeliny i oświetlenie ekranu dobierano tak, by natężenie światła padającego na ekran wynosiło 1000 na skali **D**. Przed dokonaniem odczytu należy odczekać około 10 minut od czasu włączenia aparatu. Jest to czas niezbędny dla nagrzanania. Stolik wraz z umocowanym filmem przesuwano ruchem jednostajnym notując wartości maksymalne na skali **D** dla każdej plamy, oraz wartości dla tła przy poszczególnych plamach.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Skala **D** „Schnellphotometru” przedstawia w „promillach” natężenie światła padającego na ekran. Skala **S** natomiast podaje wartości logarytmu stosunku natężenia światła wychodzącego ze źródła do natężenia światła padającego na ekran. W omawianej metodzie odczytywano na skali **D** maksymalne wartości dla poszczególnych plam, opierając się na pracach **Blocka** (2) oraz **McFarrena** (10), a następnie od tych odczytów odejmowano wartości natężenia światła dla tła, odczytywane oddzielnie przy każdej plamie. Uzyskanie tła identycznego dla całej klatki było praktycznie niemożliwe. Następnie odczytywano na skali **S** wartości odpowiadające otrzymanym wartościom **D**.

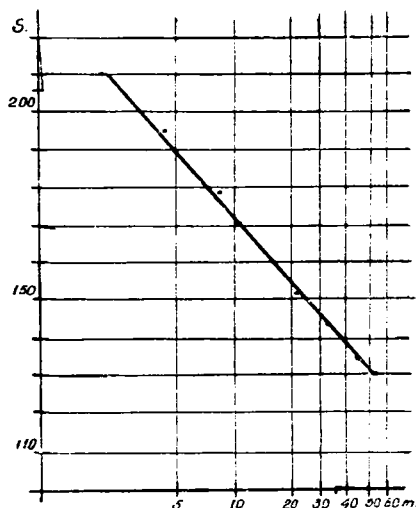
Przy ustalaniu zależności między masą aminokwasu, a odczytami ze skali **S** posłużono się prawem Lamberta—Beera, którego postać matematyczna przedstawia się następująco:

$$I_t = I_0 e^{-klc} \quad \text{stad } \lg \frac{I_0}{I_t} = klc = E$$

gdzie  $I_0$ — natężenie źródła światła,  $I_t$ — natężenie światła przepuszczonego,  $k$ —współczynnik ekstynkcji,  $l$ — grubość warstwy substancji, przez którą przechodzi światło,  $E$ — ekstynkcja,  $e$ — podstawa logarytmów naturalnych.

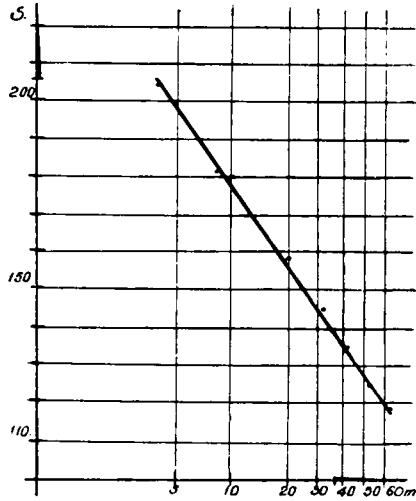
Wprawdzie prawo to odnosi się do kolorymetrii roztworów, jednak zasada opisywanej metody jest zbliżona do fotometrii roztworów barwnych i prawo Lamberta—Beera daje się tutaj częściowo zastosować.

Różnica odczytów dla plamy i tła ( $\Delta D$ ) to  $I_t$  w omawianym prawie, natomiast wartość  $I_0$  to natężenie światła padającego bezpośrednio na ekran. Przed dokonaniem odczytów wartość  $I_0$  regulowano tak, by wynosiła 1000 na skali  $D$ . Ekstynkcja  $E$  to odczyt ze skali  $S$  „Schnellphoto-metru”.

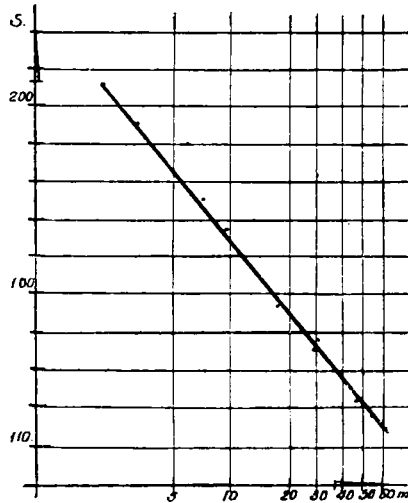


Ryc. 1. Zależność masy lizyny w  $\mu\text{g}$  (skala logarytmiczna) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru  
Relation between lysine mass in  $\mu\text{g}$  (logarithmic scale) and “S” value from the microphotometer scale

Na podstawie uzyskanych w opisany sposób wartości  $S$  dla poszczególnych plam, oraz logarytmów mas badanych aminokwasów sporządzano wykresy: ryc. 1, 2 i 3. Na osi odciętych odkładano logarytmy masy aminokwasów, a na osi rzędnych wartości  $S$ . Ryc. 1, 2, 3 przedstawiają wykresy dla lizyny, kwasu glutaminowego, oraz leucyny. Na wykresach tych zależność między wartościami  $S$ , a logarytmem masy aminokwasu występuje w postaci linii prostej nachylonej do osi odciętych pod kątem rozwartym. Zatem wartość  $S$  jest odwrotnie proporcjonalna do logarytmu masy aminokwasów — większym wartościom  $S$  odpowiadają mniejsze masy aminokwasów. Odwrotna proporcjonalność wartości  $S$  i logarytmów mas wpływa stąd, że w omawianej metodzie badano film negatywowy, na którym jaśniejsza plama odpowiada ciemniejszej na chromatogramie.



Ryc. 2. Zależność masy kwasu glutaminowego w  $\mu\text{g}$  (skala logarytmiczna) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru  
Relation between glutamic acid mass in  $\mu\text{g}$  (logarithmic scale) and „S” value from the microphotometer scale



Ryc. 3. Zależność masy leucyny w  $\mu\text{g}$  (skala logarytmiczna) od wartości „S” odczytanej na skali mikrofotometru  
Relation between leucine mass in  $\mu\text{g}$  (logarithmic scale) and „S” value from the microphotometer scale

Teoretyczna czułość podanej metody dla lizyny, kwasu glutaminowego i leucyny odpowiada czułości testu ninhydrynowego (14) i wynosi 0,1, 0,3 i 0,1  $\mu\text{g}$ . W praktyce przy prawidłowej technice fotograficznej jest ona tylko nieznacznie mniejsza. Zakres w jakim podana zależność obarczona jest najmniejszym błędem wynosi w przybliżeniu od 1  $\mu\text{g}$  do 70  $\mu\text{g}$ . Dla wartości większych pomiary stają się mniej dokładne.

Tab. 1. Błędy procentowe metody oznaczania stężenia aminokwasów za pomocą fotometrii negatywów chromatogramów

The per cent errors of determination of amino acids concentration using photometry of negative printed chromatograms

Amino- kwasy	S t ę ż e n i a												Suma $\Sigma Y_{ij}$
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	
lizyna	1,4	2,0	1,3	2,4	0	2,3	1,3	0,7	2,0	3,1	2,1	1,5	
	1,7	1,5	1,0	0	0,5	0,8	1,7	1,4	0,4	2,0	0,2	1,6	
	1,3	0,3	0,9	2,0	1,5	1,9	2,2	2,4	1,8	0,1	0,3	2,0	
	1,5	1,7	0	2,1	1,6	2,1	0,4	1,1	1,9	1,4	0,7	2,0	
	1,8	1,4	2,0	1,5	1,8	0,8	1,1	2,5	0,7	1,3	1,9	0,2	
	1,2	1,2	2,0	1,2	1,2	0,5	0,9	0,1	1,7	0,9	1,8	0	
Suma $\Sigma Y_{ij}$	9,9	8,1	7,2	9,2	6,6	8,4	7,6	8,2	8,5	8,8	7,0	7,3	97,6
kwas glutami- nowy	2,3	0,6	1,4	0	1,2	0,8	0	1,3	3,8	0,2	1,3	3,2	
	1,5	1,3	1,7	0,5	1,7	0,2	2,1	2,4	2,1	0	0,4	2,1	
	0,7	2,1	0,3	0,3	0,4	0,5	2,5	2,5	0	3,5	0,2	0	
	1,8	2,4	2,5	3,1	2,0	1,4	1,3	0,9	0,3	2,1	2,0	1,3	
	2,0	0	1,2	2,4	1,6	0,4	0,1	1,2	1,5	1,3	1,2	0,5	
	0,5	0,7	2,1	1,7	0,8	1,1	0,2	0,8	0,5	0,9	1,9	0,2	
Suma $\Sigma Y_{ij}$	8,8	7,1	10,2	8,0	7,7	5,4	6,4	8,1	8,2	8,0	7,0	7,3	91,8
leucyna	0,8	0,7	1,6	3,1	2,4	4,7	2,1	1,3	1,4	0	1,5	1,4	
	2,3	2,6	0,4	2,1	2,1	3,0	1,2	1,8	1,7	0,5	1,9	1,8	
	2,0	2,2	0	0	0,7	0	1,3	0,7	2,3	2,5	2,3	1,9	
	2,2	1,3	2,5	0,4	1,8	0,4	2,5	1,5	1,9	1,3	0,9	2,0	
	0,4	1,2	1,4	1,2	2,6	1,2	0,7	2,1	0	1,7	0,4	0,3	
	1,2	0,9	1,8	0,9	0,8	0,6	3,0	1,9	1,1	0,9	0,8	0,1	
Suma $\Sigma Y_{ij}$	8,9	8,9	7,8	7,7	10,4	9,9	10,8	9,3	8,4	6,9	8,8	7,5	105,3
Suma $\Sigma Y_{.j}$	27,6	24,1	25,2	24,9	24,7	25,7	24,8	25,6	25,1	23,7	22,8	22,1	294,7

Przy obliczaniu średniego błędu procentowego dla opisanej metody postawiono trzy pytania: 1) Czy są istotne różnice między średnimi błędami procentowymi dla poszczególnych aminokwasów? 2) Czy są istotne różnice między średnimi błędami procentowymi dla poszczególnych stę-

zeń? oraz 3) Czy jest istotna interakcja? Aby odpowiedzieć na powyższe pytania, przeprowadzono analizę wariancji dla klasyfikacji podwójnej (krzyżowej).

Błędy procentowe dla poszczególnych stężeń i aminokwasów przedstawiono w tab. 1. Każdemu z trzech aminokwasów odpowiada dwanaście stężeń od 0,001 m do 0,07 m, z których każde zawiera sześć pojedynczych oznaczeń.

Obliczenia związane z analizą wariancji przedstawiają się następująco:

$$1) \text{ „Poprawka” } C_y = \frac{\left(\sum y_{ijk}\right)^2}{n} = \frac{294,70^2}{216} = 401,90$$

2) Suma kwadratów odchyleń dla całości:

$$nS_y^2 = \sum y_{ijk}^2 - C_y = 553,62 - 401,90 = 151,72$$

3) Suma kwadratów odchyleń ze względu na aminokwasy:

$$nS_A^2 = \frac{\sum Y_{i..}^2}{72} - C_y = \frac{29043,00}{72} - 401,90 = 403,30 - 401,90 = 1,40$$

4) Suma kwadratów odchyleń ze względu na stężenia:

$$nS_B^2 = \frac{\sum Y_{.j.}^2}{18} - C_y = \frac{7326,10}{18} - 401,90 = 407,00 - 401,90 = 5,10$$

5) Suma kwadratów odchyleń między podgrupami:

$$nS_K^2 = \frac{\sum Y_{ij.}^2}{6} - C_y = \frac{2453,76}{6} - 401,90 = 408,96 - 401,90 = 7,06$$

6) Suma kwadratów odchyleń ze względu na interakcję:

$$nS_{AB}^2 = nS_K^2 - nS_A^2 - nS_B^2 = 7,06 - 1,40 - 5,10 = 0,56$$

7) Suma kwadratów odchyleń wewnątrz podgrup, czyli błąd eksperymentalny:

$$nS_e^2 = nS_y^2 - nS_K^2 = 151,72 - 7,06 = 144,66$$

Wyniki powyższych obliczeń przedstawiono w tab. 2.

$$\text{Wobec } F^\circ = \frac{V_A}{V_e} = \frac{0,70}{0,80} = 0,87 \text{ stwierdzamy z ryzykiem błędu mniejszym od}$$

1% nieistotność różnic między średnimi błędami procentowymi dla poszczególnych aminokwasów.

$$\text{Wobec } F^\circ = \frac{V_B}{V_e} = \frac{0,46}{0,80} = 0,57 \text{ stwierdzamy z ryzykiem błędu mniejszym od}$$

1% nieistotność różnic między średnimi błędami procentowymi dla różnych stężeń.

$$\text{Wobec } F^\circ = \frac{V_{AB}}{V_e} = \frac{0,02}{0,80} = 0,02 \text{ stwierdzamy z ryzykiem błędu mniejszym od}$$

1% nieistotność interakcji.

Ponieważ na podstawie analizy wariancji stwierdzono przy poziomie istotności 0,01 brak istotnych różnic między średnimi błędami procentowymi ze względu na rodzaj aminokwasu, stężenie i interakcję, można więc obliczyć średni błąd procentowy omawianej metody. Wynosi on 1,4% i waha się w granicach 0—4,7%.

Tab. 2. Analiza wariancji. Analysis of variance

Zródło zmienności	Stopnie swobody $v$	Suma kwadratów odchyień $nS^2$	Średni kwadrat $V$	$F^0$	$F_{0,01}$
1. Rodzaj aminokwasu A	2	$nS_A^2 = 1,40$	$V_A = 0,70$	0,87	19,49
2. Stężenie B	11	$nS_B^2 = 5,10$	$V_B = 0,46$	0,57	2,42
3. Interakcja AB	22	$nS_{AB}^2 = 0,56$	$V_{AB} = 0,02$	0,02	1,81
4. Błąd eksp. e	180	$nS_e^2 = 144,66$	$V_e = 0,80$	—	—
5. Całość	215	$nS_y^2 = 151,72$	—	—	—

### Wnioski

Na przykładzie trzech aminokwasów: lizyny, kwasu glutaminowego i leucyny, opracowano metodę oznaczania stężenia aminokwasów za pomocą fotometrii negatywów chromatogramów.

2. Opracowaną metodę da się zastosować i dla oznaczania stężeń pozostałych aminokwasów oraz innych substancji rozdzielonych na drodze chromatografii bibułowej lub cienkowarstwowej, pod warunkiem dobrego ich rozdzielenia.

3. Średni błąd procentowy przy poziomie istotności 0,01 w zakresie od 1 do 70  $\mu\text{g}$ , wynosi 1,4% i waha się w granicach 0—4,7% (ustalono po przeprowadzeniu analizy wariancji).

4. Teoretyczna czułość podanej metody dla lizyny, kwasu glutaminowego i leucyny odpowiada czułości testu ninhydrynowego i wynosi 0,1, 0,3 i 0,1  $\mu\text{g}$ . W praktyce przy prawidłowej technice fotograficznej jest tylko nieznacznie mniejsza.

5. Dodatkłą cechą opracowanej metody ilościowego oznaczania stężenia rozdzielonych chromatograficznie substancji jest jej dokładność, przy równoczesnej prostocie oraz szybkości i łatwości wykonania.

6. Opracowana metoda jest wystarczająco dokładna (średni błąd 1,4%), aby można ją zastosować do badania materiału biologicznego.



## PIŚMIENNICTWO

1. Block R. J.: Science **108**, 608, 1948.
2. Block R. J.: Anal. Chem. **22**, 1327—1332, 1950.
3. Bober St., Kruze D., Dąbrowa R., Iwańska J., Skrzypczyk E.: Pol. Arch. Med. Wewn. **32**, 443—454, 1962.
4. Brimley R. C.: Nature **163**, 215—216, 1949.
5. Fisher R. B., Parsons D. S.: Nature **161**, 764—765, 1948.
6. Fowden L.: Biochem. J., **48**, 327—333, 1951.
7. Hiller E., Zinnert F., Frese G.: Biochem. Zeitschrift **323**, 245—250, 1952.
8. Mc. Evay-Bove E., Lugg J. W. H.: Biochem. J. **80**, 616—623, 1961.
9. Mc. Farren E. F., Mills J. A.: Anal. Chem. **24**, 650—653, 1952.
10. Mc. Farren E. F., Brand K., Rutkowski H. R.: Anal. Chem. **23**, 1146, 1951.
11. Miettinen J. K., Moisio T.: Acta Chem. Scand., **7**, 1225—1238, 1953.
12. Mykolajewycz R.: Anal. Chem. **29**, 1300—1305, 1957.
13. Polson A.: Biochim. Biophys. Acta, **2**, 575, 1948.
14. Saifer A., Oreskes I.: Anal. Chem. **28**, 501—504, 1956.
15. Vincent W. A.: Nature **185**, 530, 1960.
16. Williams R. T., Kirby H.: Science **107**, 481—482, 1948.
17. Woiod A. J.: Biochem. J. **45**, 412, 1949.

Pracę otrzymano 25 V 1966 r.

### Количественное определение аминокислот при помощи фотометрии негативов хроматограмм

#### Резюме

Описан метод определения концентрации аминокислот при помощи фотометрии негативов хроматограмм на примере трех аминокислот: лизина, глутаминовой кислоты и лейцина.

Этот метод также применим для определения концентрации остальных аминокислот и других субстанций, тщательно разделенных при помощи бумажной и тонкослойной хроматографии.

Теоретически чувствительность этого метода для лизина составляет 0,1  $\mu\text{g}$ , для глутаминовой кислоты — 0,3  $\mu\text{g}$  и для лейцина — 0,1  $\mu\text{g}$ . Практически чувствительность при хорошо сделанных негативах несколько меньшая. Средняя процентная ошибка (с точностью до 0,01) в пределе 1—70  $\mu\text{g}$  составляет 1,4% и колеблется от 0 до 4,7% (определено после дисперсионного анализа).

Такие качества метода, как точность, простота, легкость и быстрота исполнения позволяют его применять при исследованиях биологического материала. Работы в этом направлении уже ведутся.

Рис. 1. Взаимоотношение массы лизина (логарифмическая шкала) и величины „S” шкалы микрофотометра, в  $\mu\text{g}$ .

Рис. 2. Взаимоотношение массы глутаминовой кислоты (логарифмическая шкала) и величины „S” шкалы микрофотометра, в  $\mu\text{g}$ .

Рис. 3. Взаимоотношение массы лейцина (логарифмическая шкала) и величины „S” шкалы микрофотометра, в  $\mu\text{g}$ .

Табл. 1. Процентная ошибка метода определения концентрации аминокислот при помощи фотометрии негативов хроматограмм.

Табл. 2. Дисперсионный анализ.

## Quantitative Determination of Amino Acids Using Photometry of Negative Printed Chromatograms

### Summary

The method of determination of amino acid concentration using photometry of negative printed chromatograms was described. Three amino acids: lysine, glutamic acid and leucine were determined.

Using paper and thin-layer chromatography it is possible to apply this method for the determination of ether amino acids and other separated substances.

Theoretical sensitivity for lysine, glutamic acid and leucine is 0.1, 0.3 and 0.1  $\mu\text{g}$ , respectively. The difference between the theoretical and practical sensitivity is very slight, if photographic procedure is correct.

The average per cent error (significance level 0.01) in the range of 1—70  $\mu\text{g}$  is 1.4% (from 0 to 4.7%). It was established on the basis of the variance analysis.

This method is accurate, simple and sensitive enough to be applied in research of biological material (this problem is being investigated).