

Jan KOZAK

**Oznaczanie pepsyny w soku żołądkowym przy pomocy trawienia  
surowicy krwi ludzkiej we własnej modyfikacji**

Модифицированный автором способ определения пепсина в желудочном соке  
при помощи дигестии человеческой сыворотки

The Determination of Pepsin in Stomach Juice by Digesting Human Serum

Oznaczanie zawartości pepsyny w soku żołądkowym ma duże znaczenie praktyczne w ustalaniu stanu czynnościowego błony śluzowej żołądka. Piśmiennictwo, zwłaszcza zagraniczne, dotyczące metodyki oznaczania tego fermentu jest dość obszerne (1, 2, 3, 5, 7, 8, 14, 15, 16, 18, 19, 25, 27). W Polsce wiele prac poświęcili temu zagadnieniu Czystohorski, Gomółka, Krówczyński i Smajkiewicz, Florckiewicz, Niewiarowski i inni (10, 11, 12, 13, 17, 20, 23). Krówczyński i Smajkiewicz, opisując swoją metodę płytkowego oznaczania aktywności pepsyny, podali szczegółowo różne sposoby ilościowego jej określania przez innych autorów (20). Oznaczanie tego fermentu w soku żołądkowym nie weszło jednak w zakres badań rutynowych. Złożyło się na to wiele przyczyn, między innymi długo utrzymujące się, niesłuszne przekonanie, że poziom pepsyny w soku żołądkowym jest wprost proporcjonalny do jego kwasoty (1, 2, 21, 24). Tymczasem w ostatnich dziesiątkach lat liczni autorzy wykazali, że zachowanie się jej w soku żołądkowym nie zawsze idzie w parze z kwasnością (9, 15, 25, 26). Poza tym znane dotychczas proste metody oznaczania pepsyny są zazwyczaj mało dokładne, natomiast te, które dają dokładniejsze wyniki, wymagają drogiej i precyzyjnej aparatury oraz są bardzo pracochłonne.

Mając na uwadze powyższe trudności opracowałem metodę elektrokolorymetryczną oznaczania pepsyny w soku żołądkowym własnej modyfikacji, opartą na trawieniu surowicy ludzkiej.

**METODYKA I WYNIKI BADAŃ**

Oznaczanie pepsyny w soku żołądkowym oparte zostało na trawieniu inaktywowanej surowicy ludzkiej. Ubytki białka określa się metodą elektrokolorymetryczną. Przy kalibrowaniu używa się pepsyny sproszkowanej produkcji polskiej

oraz surowicy ludzkiej, zlewkowej, pochodzącej od kilku osób. Mieszanina kilku surowic różnych osób gwarantuje niewielki rozrzut procentowy zawartego białka i jego frakcji. Celem wykluczenia możliwości wpływu na trawienie różnych fermentów zawartych w surowicy poddawano ją inaktywacji przez podgrzewanie w łaźni wodnej o temperaturze 56°C w ciągu 30 min. Opracowanie metody ilościowego oznaczania pepsyny w soku żołądkowym wymagało badań porównawczych z trawieniem surowicy ludzkiej pepsyną sproszkowaną w tych samych warunkach standardowych. Przyjmując na podstawie literatury, że 1 ml prawidłowego soku żołądkowego zawiera około 1 mg pepsyny krystalicznej przeprowadziłem najpierw badania z trawieniem 0,1 ml surowicy ludzkiej o zawartości 6 g% białka całkowitego przy użyciu 1 mg pepsyny sproszkowanej (4, 17, 21). W tym celu w każdej z 5 próbek 12 ml przygotowałem po 1 ml roztworu 100 mg% pepsyny, do którego dodałem 0,1 ml surowicy inaktywowanej oraz 0,1 ml 1N kwasu solnego. We wszystkich badaniach objętość trawionego roztworu była jednakowa, wynosiła 1,2 ml w każdej próbówce. Trawienie przeprowadziłem w warunkach optymalnego działania pepsyny, tj. przy pH 2, w łaźni wodnej o temp. 37°C. W I próbówce oznaczano białko bezpośrednio po sporządzeniu roztworu, natomiast w II — po 15 min., w III — po 30 min., w IV — po 45 min. i w V po 60 min. przebiegu trawienia. Reakcja trawienna była przerywana dodaniem do substratu 6 ml odczynnika Kingsley'a. Następnie dopełniałem roztwór w każdej próbówce do 10 ml i oznaczałem wartość ekstynkcji spektrofotometrem „Spectronic 20” przy długości fali 540 milimikrona i grubości warstwy badanego płynu 10 mm. Jeśli badany roztwór

Tab. 1. Wyniki skuteczności inaktywacji surowicy ludzkiej przy temp. 56°C przez 30 minut oraz trawienie surowicy ludzkiej i albuminy suchej jaja kurzego pepsyną sproszkowaną

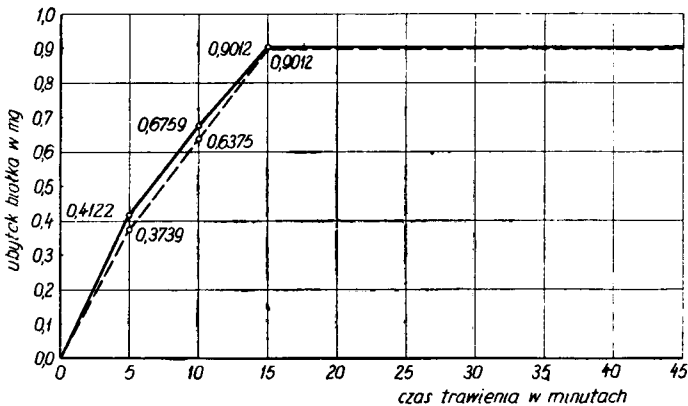
Results of inactivation of human serum at temperature 56°C during 30 minutes, and the digestion of human serum and dry albumen of hen's egg with pulverized pepsin

Liczba porządkowa	Ilość analiz	Czas trwania w minutach	Rodzaj i ilość substratu		1/2 N. Kwas solny w ml	100 mg % roztwór pepsyny sproszkowanej krajowej w ml	Roztwór soli fizjologicznej w ml	Ubytek strawionego białka w mg
			Białko surowicy ludzkiej inaktywowanej w mg	Albumina czysta jaja kurzego w mg				
1	10	15	6.0	—	—	—	1.0	0
		30 i 45	6.0	—	—	—	1.0	0
2	10	15	6.0	—	0.2	—	1.0	0
		30 i 45	6.0	—	0.2	—	1.0	0
3	10	15	6.0	—	0.2	1.0	—	0.90
		30 i 45	6.0	—	0.2	1.0	—	0.90
4	10	15	—	6.0	0.2	1.0	—	0.90
		30 i 45	—	6.0	0.2	1.0	—	0.90

wykazywał zmętnienie, wirowano go zwykłą wirówką. Tym samym aparatem określano współczynnik kalibracyjny metody do obliczania białka surowiczego, który wynosił  $f = 0,02253$ . Zawartość białka w surowicy ( $E$ ) obliczano z odczytu ekstynkcji na spektrofotometrze i współczynnika kalibracyjnego do obliczania białka surowiczego ( $f$ ) wg następującego wzoru: ilość białka surowiczego w mg =  $E \times f \times 1000$ . Ubytek strawionego białka surowiczego obliczano z różnicy ekstynkcji przed trawieniem ( $E_p$ ) i po trawieniu ( $E_k$ ), stosownie do wzoru: ilość trawionego białka surowiczego w mg =  $(E_p - E_k) \times f \times 1000$ .

W podobnych warunkach przeprowadziłem trawienie 1 miligramem pepsyny sproszkowanej 6 mg albuminy suchej jaja kurzego. Wyniki trawienia surowicy ludzkiej i albuminy suchej jaja kurzego oraz skuteczności inaktywacji surowicy ludzkiej przedstawia tab. 1.

Celem dokładniejszego poznania przebiegu reakcji trawiennej powtórzałem badania trawienia surowicy i albuminy suchej jaja kurzego w tych samych warunkach standardowych z tym, że ubytki substratów oznaczałem w ciągu pierwszych 15 minut co 5 minut a w ciągu reszty godziny co 15 minut. Wyniki tych badań wykazuje ryc. 1.



Ryc. 1. Przebieg reakcji trawienia 0,1 ml surowicy ludzkiej o zawartości 6% białka oraz 6 mg albuminy suchej jaja kurzego przez 1 mg pepsyny przy pH 2 i temp. 37°C. Oznaczenia dokonywano w ciągu 45 min. w odstępach 5 minutowych. Krzywa ciągła odnosi się do surowicy, przerywana — do albuminy jaja kurzego

The course of digestion reaction of 0.1 ml of human serum containing 6 g% of protein and 6 mg of dry albumen of hen's egg with 1 mg of pepsin at pH 2, and at 37°C. Measurements were performed over a period of 45 minutes at intervals of 5 minutes. The continuous curve refers to human serum, and the interrupted one — to albumen of hen's egg

Różna zawartość pepsyny w soku żołądkowym poszczególnych osób wymagała prześledzenia trawienia jednakowych ilości surowicy ludzkiej z różnymi dawkami pepsyny sproszkowanej. Średnie ich wyniki z 10-krotnych oznaczeń przedstawia tab. 2.

Tab. 2 wykazuje, że ubytki strawionego białka zależne są nie tylko od ilości użytej pepsyny, lecz również i od substratu. Bardzo znamienne jest zależność tych ubytków w przeliczeniu odsetkowym. Dla przykładu na ryc. 2 podano w odsetkach ubytki otrzymane przy trawieniu różnych ilości substratu 1 mg pepsyny sproszkowanej.

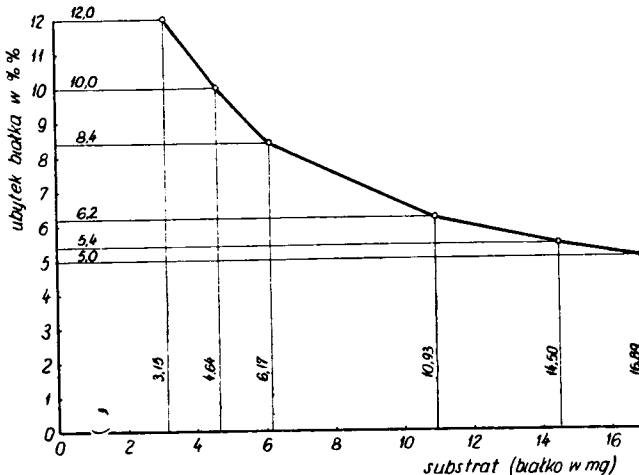
Tab. 2. Zależność ubytku białka surowiczego, trawionego pepsyną sproszkowaną od jej ilości i stężenia substratu. Substrat poddany trawieniu wykazuje w ostatniej kolumnie ilość surowicy ludzkiej w ml., w przedostatniej zaś ilość białka w mg według odczytu ekstynkcji

Dependence of decrease of serum protein digested with pulverized pepsin on its amount and concentration of the substrate. The substrate digested shows: the amount of human serum in ml (the last column), the amount of protein in mg based on extinction (column next to the last)

Pepsyna w mg		Ubytki strawionego białka surowiczego w mg.					
5.0		0.7434	0.9162	1.1490	1.3067	1.4193	1.4644
4.0		0.6984	0.8836	1.1265	1.2616	1.3351	1.4193
3.0		0.6533	0.8561	1.0589	1.1940	1.2616	1.3292
2.0		0.6080	0.8110	0.9913	1.1039	1.1715	1.2166
1.0		0.5406	0.7209	0.9012	0.9913	1.0363	1.0814
0.75		0.4055	0.6007	0.7209	0.8336	0.9012	0.9687
0.5		0.3828	0.4652	0.5216	0.6759	0.7885	0.8561
Substrat	Białko w mg	3.1542	4.6412	6.1732	10.9310	14.5093	16.8932
	Surowica w ml	0.05	0.075	0.1	0.2	0.3	0.4

Przedstawione powyżej badania trawienia surowicy zlewkowej pepsyną sproszkowaną pozwoliły na zrozumienie doświadczeń przy określaniu ilościowym pepsyny w soku żołądkowym. Przy oznaczaniu jej zawartości w soku żołądkowym postępowanie było podobne, tylko zamiast 1 ml 100 mg% pepsyny sproszkowanej brano do trawienia 1 ml soku żołądkowego, homogenizowanego i przesączonego przez gazę. Celem otrzymania roztworu o stężeniu jonów wodorowych o pH 2 do 1 ml soku żołądkowego i 0,1 ml surowicy ludzkiej dodawano, pod kontrolą pehametru, stężony kwas solny względnie wodę destylowaną do objętości 1,2 ml roztworu. Trawienie trwało 1 godzinę a ubytki białka surowiczego określałem co 15 minut. Zawartość pepsyny w mg w 1 ml soku żołądkowego określałem, dzieląc strawione nim białko w 0,1 ml surowicy w ciągu 45 minut przez 0,9 mg, tj. ilość białka strawionego 1 mg pepsyny sprosz-

kowanej w tej samej ilości surowicy i w tych samych warunkach stosownie do następującego wzoru: ilość pepsyny w mg w 1 ml soku żołądkowego =  $\frac{(E_p - E_k) \times f \times 1000}{0,9}$ . Ilość pepsyny w 1 ml soku żołądkowego grupy kontrolnej określana moją metodą wahała się od 1,0 do 1,5 mg, średnio 1,3 mg.



Ryc. 2. Zależność odsetkowych ubytków białka surowiczego od stężenia substratu trawionego przez 1 mg pepsyny sproszkowanej w ciągu 45 min. przy pH i temp. 37°C  
 A dependence of percentage decrease of serum protein on the concentration of the substrate digested with 1 mg of pulverized pepsin during 45 minutes at pH 2, and temperature of 37°C

OMÓWIENIE

Oznaczanie ilościowe pepsyny w soku żołądkowym przy pomocy trawienia surowicy krwi ludzkiej przeprowadzał Garcio-Morato Castano (14). W metodzie swej do badania brał 1,5 ml surowicy i 2 ml soku żołądkowego. Trawienie trwało 15 min. przy temp. 38°C. Oznaczanie wyników dokonywano elektrokolorymetrycznie. Jednakże metoda ta jest bardzo pracochłonna, mimo że samo trawienie trwa 15 minut, poza tym wymaga dużej ilości surowicy, która brana od pojedynczych osób wykazuje duże różnice ilościowe i jakościowe zawartego białka, co nie jest obojętne przy otrzymywaniu wyników trawienia. Metodę oznaczania pepsyny w soku żołądkowym, podaną przez Garcio-Morato Castano, zmodyfikowałem w ten sposób, że zamiast surowicy pochodzącej od jednej osoby użyłem surowicy zlewkowej od kilku osób i w ilości 15-krotnie mniejszej, a zamiast 2 ml użyłem 1 ml soku żołądkowego. Trawienie przeprowadzano przy temp. 37°C a nie 38°C, a przebieg reakcji

trawiennej przerywano odczynnikiem Kingsleya. Ponieważ w mojej metodzie nie wytrącano białka kwasem trójchlorooctowym, substrat niemal zawsze był klarowny i rzadko zachodziła potrzeba jego przesączania. Przeprowadzone badania wykazały, że tzw. surowice zlewkowe mają nieduży rozrzut odsetkowy zarówno białka całkowitego, wahający się od 6,0 do 6,6 g%, jak i poszczególnych jego frakcji. Wykazano również, że trawienie 0,1 ml różnych surowic zlewkowych inaktywowanych, daje niemal identyczne ubytki trawienne.

W tab. 1 w dwu pierwszych rzędach poziomych wykazano, że surowica po inaktywacji bez dodania do niej pepsyny sproszkowanej nie dała ubytku białka. Dowodzi to, że sposób inaktywacji surowicy był przeprowadzony właściwie i zniszczył zawarte w niej fermenty proteolityczne. W dwu dalszych rzędach wykazano, że trawienie 1 mg pepsyny sproszkowanej zarówno 6 mg białka surowiczego inaktywowanego, jak i 6 mg albuminy suchej jaja kurzego daje jednakowy ubytek białka, wynoszący 0,9 mg zarówno w ciągu 15 jak i 45 minut. Określenie tego ubytku było konieczne do oznaczania ilościowego pepsyny w soku żołądkowym.

Z ryc. 1 wynika, że trawienie jednakowych ilości białka surowiczego i albuminy jaja kurzego pepsyną sproszkowaną w naszych warunkach standardowych przebiegało w ciągu 15 min., niemal równoległe i po linii prostej. W ciągu dalszej obserwacji nie zauważono już ubytków białka. Dowodzi to, że przebieg reakcji trawiennej zakończył się w ciągu 15 min. oraz, że surowica ludzka inaktywowana jest równie dobrym substratem, jak albumina sucha jaja kurzego (1, 6, 20, 22, 25). Zaznaczyć należy, że surowica inaktywowana może pozostawać przez kilka dni i nadaje się do użytku jako substrat.

Przedstawione wyniki w tab. 2 wykazują, że przy trawieniu substratu o jednakowej zawartości białka surowiczego, wzrastające dawki pepsyny zwiększają wprawdzie ubytki trawionego białka, ale nie wprost proporcjonalnie. Przy zwiększeniu pepsyny 10-krotnie, ubytek białka przy trawieniu jednakowej ilości substratu zwiększa się w przybliżeniu tylko 2-krotnie. Można przypuszczać, że pepsyna przy zwiększaniu jej podczas trawienia po osiągnięciu pewnej granicy nie będzie powodowała dalszego ubytku trawionego białka. Wykazują to cyfry w kolumnach pionowych. Podobne zjawisko w trawieniu zachodziło przy zwiększeniu substratu przy zachowaniu jednakowych ilości pepsyny. Wykazują to cyfry w rzędach poziomych. Krzywa hiperparaboliczna na ryc. 2 ilustruje w sposób wyraźny, że odsetkowy ubytek białka przy trawieniu 1 mg pepsyny sproszkowanej wzrasta w miarę zmniejszania się użytego substratu, a maleje w miarę zwiększania się. Uwidocznione wyniki w tab. 2 i ryc. 2 wykazują, że optymalne warunki trawienia w naszym układzie standardowym, tj. przy temp. 37°C i pH 2 zachodzą przy doborze dla 1 mg

pepsyny 0,1 ml i mniejszych ilości surowicy ludzkiej. Ponieważ prawidłowy sok żołądkowy zawiera w 1 ml około 1 mg pepsyny sproszkowanej — celem utrzymania optymalnych warunków trawienia użyłem dla 0,1 ml surowicy 1 ml soku żołądkowego. Dobór optymalnych warunków trawienia zwiększa dokładność wyników (2, 8, 9, 15, 17, 20, 23, 25).

W moich badaniach przebieg reakcji trawiennej pepsyną sproszkowaną kończył się zawsze w ciągu 15 minut, natomiast przy użyciu soku żołądkowego w ciągu 15 minut tylko w 55%, w ciągu zaś 30 minut w 96%, a w 100% dopiero po 45 minutach (na 300 oznaczeń). Z tego względu przyjąłem w swoich badaniach czas trawienia 45-minutowy. Przyczyna opóźnionego trawienia pepsyną soku żołądkowego, w porównaniu ze sproszkowaną, nie jest jasna i była tematem badań wielu autorów jak Chinn, Book, Beams, Orłowski, Masłow, których wypowiedzi są różne, niekiedy kontrowersyjne (9, 22, 24). Być może, że w grę wchodzi tu czynniki hamujące trawienie, znajdujące się w soku żołądkowym (22, 24). Niektórzy autorzy, jak Chinn, Book, Beams i inni twierdzą, że sok żołądkowy nie ma żadnych ciał hamujących trawienie. Na podstawie własnych badań nie stwierdziłem, by opóźnienie trawienia soku żołądkowego w stosunku do pepsyny sproszkowanej było uzależnione od ilości zawartej w nim pepsyny. Obserwowałem zakończenie trawienia w jednakowym czasie tak przy niskich, jak i wysokich wartościach pepsyny soku żołądkowego. Wynika z tego, że na szybkość reakcji soku żołądkowego miały wpływ inne czynniki poza pepsyną, być może zawartość wolnego kwasu solnego, śluzu, elektrolitów itp. (15, 25).

Metoda określania pepsyny w soku żołądkowym, podana przeze mnie, jest prosta, szybka i dokładna, nie wymaga skomplikowanej aparatury, ani odczynników. Może ją wykonywać każde laboratorium, które posiada fotokolorometr. Użycie jako substratu surowicy ludzkiej zlewkowej ma duże znaczenie praktyczne, gdyż jest to materiał łatwo dostępny, niejako odpadkowy w laboratorium. Zawartość pepsyny w soku żołądkowym określana jest w mg w odniesieniu do pepsyny sproszkowanej użytej przy kalibracji. Potrzebny czas na oznaczanie pepsyny podanym sposobem jest stosunkowo krótki, wynosi około 2 godzin.

Inne proste metody oznaczania pepsyny w treści żołądkowej, znane mi z dostępnej literatury, są przeważnie mało dokładne (5, 7, 16, 17, 18, 19, 27). Natomiast te, które dają wyniki dokładne, wymagają precyzyjnej aparatury, kosztownych odczynników oraz są pracochłonne (2, 3, 13, 14, 20, 25). Względny te były bodźcem do opracowania przeze mnie podanej wyżej metody, która, z uwagi na wymienione zalety, winna znaleźć zastosowanie praktyczne przy oznaczaniu zawartości pepsyny w soku żołądkowym.

## WNIOSKI

1. Oznaczanie pepsyny w soku żołądkowym przy pomocy trawienia surowicy ludzkiej, zlewkowej, inaktywowanej, w podanej modyfikacji, jest łatwe, dokładne i nie wymaga skomplikowanej aparatury laboratoryjnej.

2. Czas wykonania badania wynosi około 2 godz.

3. Stężenie pepsyny w soku żołądkowym określane jest w mg. W naszych badaniach norma wahała się w grupie kontrolnej od 1,0 do 1,5 mg, średnio 1,3 mg w odniesieniu do pepsyny sproszkowanej produkcji polskiej.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abderhalden R.: *Klinische Enzymologie*. Basel 1958.
2. Anson M. L.: *J. Gen. Physiology* 22, 79—86, 1938.
3. Anson M. L., Mirsky A. E.: *J. Gen. Physiology*. 10, 59—69, 1932.
4. Baranowski F.: *Związy Podręcznik Chemii Fizjologicznej*. PZWL, Warszawa 1959.
5. Barowsky H., Uphan R., Dotti B., Kleiner I. S.: *Rev. Gastroenterol.* 10, 201—206, 1943.
6. Bladergroen W.: *Wstęp do energetyki i procesów biologicznych*. PWN, Warszawa 1957.
7. Boas I.: *Dtsch. Med. Wsch.* 51, 511—515, 1925.
8. Buchs S., Frendenber g E.: *Experientia*, 17, 21—22, 1961.
9. Chinn A. B., Book D. T., Beams R. J.: *Gastroenterology*. 18, 427—439, 1951.
10. Czystohorski T.: *Roczniki AM. im. Marchlewskiego w Białymstoku*, 2, 39—51, 1956.
11. Czystohorski T.: *Farm. Pol.* 11, 291—293, 1957.
12. Czystohorski T., Homańska H.: *Pol. Tyg. Lek.* 9, 155—159, 1961.
13. Florkiewicz H.: *Pol. Tyg. Lek.* 14, 1925—1933, 1959.
14. Garcia-Morato Castano V.: *Arch. Med. Exptl. (Madrit)* 15, 197—207, 1952, cyt. *Chem. Abstr.* 47, 5476, 1953.
15. Gilman R., Cowgill G. R.: *J. Biol. Chem.* 88, 743—746, 1930.
16. Glassner K.: *Biochem. Zscht. Berlin* 312—315, 1922.
17. Gmółka J.: *Przegl. Lek.* 10, 278—281, 1954.
18. Hunt J. N.: *Biochem. J.* 42, 104—109, 1928.
19. Kemper W.: *Arch. Verdau Kr.* 47, 87—91, 1930.
20. Króweczyński L., Smajkiewicz A.: *Acta Pol. Pharm.* 1, 41—44, 1957.
21. Marchlewski L., Skarżyński B.: *Chemia Fizjologiczna*. Kraków 1950.
22. Mosłow W. W.: *Biochimija*. 24, 285—91, 1959.
23. Niewiarowski S., Latałło Zb.: *Postę p. Hig. i Med. Dośw.* 12, 21—31, 1958.
24. Orłowski W.: *Choroby wewnętrzne. Narząd trawienia*. Tom. V. Warszawa 1949.



25. Piper D. W.: *Gastroenterology*. **38**, 616—621, 1960.
26. Poliner I. J., Spiro H. M.: *Gastroenterology*. **34**, 196—209, 1958.
27. Takata M.: *The Tohoku J. of Exptl. Med.*, **2**, 127—130, 1925.
28. Tokuyasu K., Tunatsu M.: *J. Biochem. (Tokyo)* **49**, 297—302, 1961.

Otrzymano 8 VII 1968.

## РЕЗЮМЕ

Описывается модифицированный автором электрофотометрический метод определения пепсина в желудочном соке при помощи дигестии человеческой сыворотки, взятой у нескольких человек. Для количественного определения пепсина была проведена сравнительная дигестия 0,1 мл сыворотки в 1 мл желудочного сока и 1 мг порошкообразного пепсина польского производства при температуре 37°C и pH = 2 в течение 45 мин. Количество переваренного сывороточного белка вычислялось из разницы экстинкции белка перед дигестией ( $E_p$ ) и после ( $E_k$ ), а также из калибрационного коэффициента для подсчета сывороточного белка ( $f$ ) по формуле: убыток переваренного белка (в мг) =  $(E_p - E_k) \times f \times 1000$ .

Содержание пепсина (в мг) в 1 мл желудочного сока подсчитывалось путем деления количества переваренного сывороточного белка в 1 мл желудочного сока на 0,9, т. е. количество (мг) белка, переваренного 1 мл порошкообразного пепсина в наших стандартных условиях по формуле: содержание пепсина (в мг) в 1 мл желудочного сока =  $\frac{(E_p - E_k) \times f \times 1000}{0,9}$

Описанный метод заслуживает внимания из-за легкого, быстрого выполнения, получения довольно точных результатов, и притом не требует ни сложной аппаратуры, ни реактивов.

## SUMMARY

The author presents the electrophoretic method of determining pepsin in stomach juice by digesting mixed human serum. By this method 1 mg of pulverized pepsin is digested by 0.9 mg of protein serum. The content of pepsin in 1 ml of stomach juice was calculated by dividing the amount of digested mixed protein serum by 0.9 mg. The above method is easy and not time-consuming. The results obtained by it are not charged with a high error. This method does not require the use of complicated apparatus and reagents.

---

Papier druk. sat. III kl. 80 g  
Annales UMCS Lublin 1968  
800+60 egz. F-3

Format 70 × 100  
Lub. Zakł. Graf. Lublin, Unicka 4  
Manuskrypt otrzymano 27.V.69

Druku str. 10  
Zam. 2070. 27.V.69  
Data ukończenia 30.X.69

---