

Л. С. МАРКОСЯН

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ
ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ

В последние годы метод хроматографии на бумаге широко применяется как для качественного, так и для количественного определения аминокислот [1—11].

Основное преимущество хроматографии на бумаге по сравнению с другими методами определения аминокислот заключается в том, что для полного количественного определения аминокислот требуются очень малые количества (1—2 мг белка) исследуемого материала.

Несмотря на все достоинства этого метода, он еще далеко не усовершенствован и имеет ряд недостатков.

Так например, не всегда получается хорошее разделение аминокислот на бумаге. При этом, наряду с качеством бумаги, температурой воздуха, степенью влажности хроматографической камеры и другими факторами, большое значение имеет также соотношение количеств аминокислот в исследуемом материале. Интенсивность окрашивания нингидринового комплекса аминокислот также подвергается изменениям под влиянием разных факторов, которые подробно описаны в книге Хейса и Мацека [7], Е. А. Ермаковой [8] и др.

При исследовании аминокислотного состава белков пшеницы мы столкнулись с необходимостью внести некоторые изменения и усовершенствования в метод хроматографического определения аминокислот на бумаге.

Ниже мы описываем предложенный нами метод, который в ходе работы дал вполне удовлетворительные результаты.

Подготовка материала. Гидролиз. Белки (15 мг) гидролизировались с 200 частями перегнанной 6 HCl в запаянных ампулах в течение 24 часов при 105—108°C. По окончании гидролиза HCl отгонялся под вакуумом при 35—40°C. Для удаления остатков кислоты осадок растворялся в 15—20 мл бидестилята и вновь упаривался при вышеуказанных условиях. Эту процедуру следует повторять четыре-пять раз. Затем остаток растворялся в точном объеме бидестилята и отфильтровывался с отсасыванием в стеклянную трубку, на конце которой укреплен бумажный фильтр (рис. 1). Готовый гидролизат можно долгое время хранить при 0°C с тимолом.

Для определения триптофана гидролиз белка проводился 14% раствором Ва (ОН)₂ в течение 24 часов при 120—125°C (Блок Дж. [5]). Далее триптофан определялся по методу Горна и Джонса [9].

Пролин после кислотного гидролиза определялся по методу Арчера

и др. [10], используя при этом специфическую реакцию пролина с изотином.

Аминокислоты. В качестве свидетелей при хроматографировании и для составления стандартных кривых использовались продажные препараты аминокислот, главным образом, отечественного производства. При этом отсутствие в препаратах других аминокислот в качестве примеси предварительно проверялись при помощи хроматографии на бумаге.

Бумага. Нами была использована бумага отечественного производства «Хроматографическая бумага Ленинградская медленная», которая отмывалась от «загрязнений», в том числе от ионов двухвалентных металлов. Бумага использовалась в полосках 22×5 см.

Для отмывания бумаги использовалась одна из следующих смесей: 1) 0,5% раствор версена (этилендиаминтетрауксусная кислота), подщелоченный NaOH до pH 8. В течение 30—40 минут полоски бумаги промывались в 1,5—2 литрах этого раствора в камере из органического стекла (рис. 2). Затем бумага отмывалась 2—3 л бидистилата и суши-

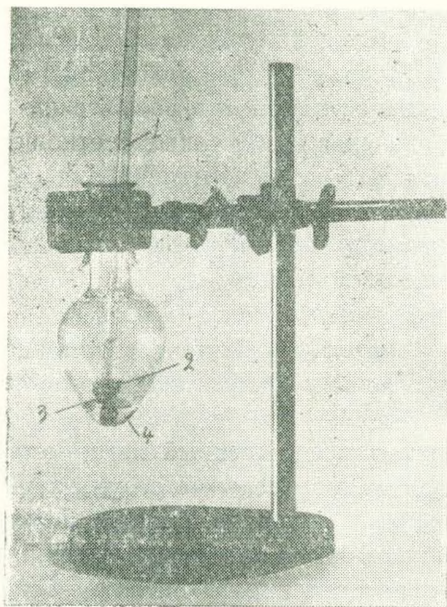


Рис. 1. Фильтрация белкового гидролизата. 1—Стекло́нная трубка, 2—бума́жный фильтр, 3—рези́новое кольцо, 4 — гидролизат.

лась на воздухе. 2) 0,7% раствор 8-оксихинолина в смеси с п-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1). Полоски бумаги медленно проводились через этот раствор, затем отмывались в хроматографической камере вышеуказанной смесью, но уже без 8-оксихинолина и сушились на воздухе.

Растворители. Нами были использованы три системы растворителей: 1) п-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1) для разделения

цистина, лизина, гистидина, аргинина, аланина, глицина, треонина, тирозина и фенилаланина;

2) фенол, забуференный фосфатным буфером pH 12 (1:1) по Мак Фаррену [11] (фенол перегонялся при 181°C) для разделения аспарагиновой и глутаминовой кислоты, серина, глицина, треонина и аланина;

3) о-крезол, забуференный фосфатным буфером pH 6,2—6,4 по Мак Фаррену (о — крезол перегонялся при 191°C) для разделения трео-

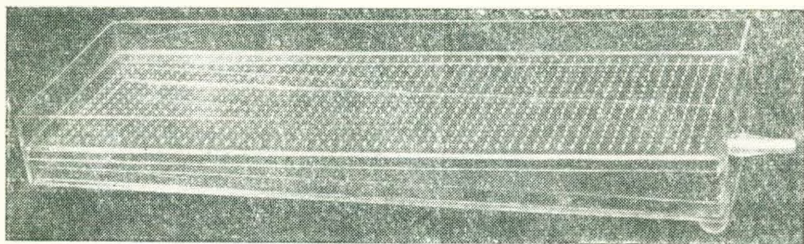


Рис. 2. Камера из органического стекла для промывания хроматографической бумаги в 0,5% растворе версена, подщелоченном с NaOH до pH 8.

нина, аланина, тирозина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, пролина, фенилаланина.

Использовались свежеприготовленные смеси.

Количественное определение. На основании литературных данных (Фишер и Дорфель [16]), Кейл [12] и др.) и проведенных нами пробных опытов по разделению аминокислот способом двумерной, одномерной восходящей и одномерной нисходящей хроматографии на бумаге, мы остановились на последнем способе.

Преимущество метода бумажной хроматографии (в отличие от двумерной) заключается в том, что он позволяет производить более точные количественные определения аминокислот, при условии одновременного хроматографирования стандартной смеси аминокислот в абсолютно одинаковых условиях с исследуемым гидролизатом.

Другое преимущество одномерной хроматографии заключается в том, что только этим способом одновременно на одном и том же листе бумаги можно исследовать несколько образцов.

Раствор исследуемого материала наносился в виде узкой полосы длиной 2 см на расстоянии 6—7 см от верхнего конца бумаги. Полоски исследуемого раствора удобно наносить тонким стеклянным капилляром, набирая в него раствор из микропипетки для ориентировочного определения наносимого количества. Точное количество определялось по разнице весов капилляра до и после нанесения исследуемого раствора. После высушивания нанесенного раствора на бумагу, ускоренного струей теплого воздуха, проводится разделение аминокислот в соответствующем растворителе.

Разделение аминокислот в смеси п-бутанол — уксусная кислота — вода проводилась повторным пропусканием (3, 4, 5 раз) растворителя че-

рез хроматограмму, при этом во избежание слияния пятен фенилаланина и лейцинов фронт растворителя 4—5-й раз не должен спуститься ниже $\frac{2}{3}$ бумаги. При разделении аминокислот в забуференных растворах фенола и о-крезола пропускание растворителя вполне достаточно для получения хороших результатов.

На рис. 3 и 4 показаны примеры разделения аминокислот с помощью вышеуказанных двух растворителей.

Мак Фаррен [13] при хроматографировании в феноле предлагает забуферевать предварительно кроме растворителя также и бумагу. Однако, как показали наши опыты, в этом случае не получается четкого отделения серина от глютаминовой кислоты, особенно в том случае, если одна из указанных аминокислот находится в исследуемом материале в большом количестве. Кроме того, в опытах с забуференной бумагой происходит пожелтение хроматограммы после обработки нингидрином. При этом бумага желтеет неравномерно, так как смещение реакции среды к концу бумаги в более щелочную сторону вызывает усиление желтого фона. Наличие такого фона нежелательно, поскольку при этом значительно искажаются результаты количественного определения аминокислот. Вместе с тем, аминокислоты на незабуференной бумаге разделяются плохо. Для лучшего определения мы предлагаем наносить 2—3 капли фосфатного буфера ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaOH}$) с pH 12 только на то место бумаги, на которое наносится исследуемый раствор.

При разделении аминокислот в растворе о-крезола необходимо соблюдать следующие условия: следить за движением фронта растворителя, не давая последнему стекать с бумаги, так как фенилаланин движется очень близко с фронтом растворителя, хроматографирование проводить без насыщения камеры водой или растворителем (рис. 5), что является необходимым условием для хорошего разделения треонина и аланина. Разделение остальных аминокислот этой группы — тирозина, метионина, изолейцина, лейцина, пролина и фенилаланина — проводится в водонасыщенной камере (рис. 6).

Следует отметить также, что не во всех случаях удастся получить хорошее отделение лейцина от изолейцина. Большое значение имеет в данном случае количество этих аминокислот. Если количество их невелико — разделение получается хорошее.

В случае хроматографии в о-крезоле, необходимо забуферивать всю бумагу. В противном случае, вместо четких, компактных пятен получаются длинные размазанные полосы.

Дальнейшая обработка хроматограмм во всех случаях проводится одинаково.

После прохождения растворителей хроматограммы сушились на воздухе, лишенном аммиака, при комнатной температуре до полного удаления растворителей. При плохом, неполном удалении растворителя, после проявления нингидрином появляется фиолетовый фон (реакция нингидрина с NH_3 воздуха), который мешает дальнейшему количественному определению.

После высушивания хроматограммы протягивались через 1% раствор нингидрина в безводном ацетоне и затем выдерживались на воздухе при комнатной температуре в течение 5 часов до максимального развития окраски.

Идентификация аминокислот на хроматограммах производилась с помощью свидетелей и по значениям величины R_f (табл. 1),

Таблица 1
Значения R_f * аминокислот на Ленинградской медленной бумаге в различных растворителях

Аминокислоты	В смеси п-бу- танол-уксусная ки- слота — вода (1)	В феноле, забуфе- ренным фосфат- ным буфером pH 12	В о-крезоле забуферен- ном буфером pH 6,2	
			в сухой камере	во влажной камере
Цистин	0,13	—	—	—
Цистеиновая кислота	0,16	0,04	—	—
Лизин	0,26	—	—	—
Гистидин	0,31	—	—	—
Аргинин	0,35	—	—	—
Аспарагиновая кислота	0,44	0,10	—	—
Серин	—	0,40	—	—
Глицин	0,48	0,47	—	—
Глутаминовая кислота	0,55	0,22	—	—
Треонин	—	0,55	0,7	—
Аланин	0,62	0,63	0,11	—
Пролин	0,66	—	0,65	0,71
Тирозин	0,71	—	0,16	0,22
Метионин	—	—	—	0,43
Валин	0,76	—	—	0,36
Фенилаланин	0,83	—	—	0,80
Лейцин	—	—	—	0,64
Изолейцин	0,88	—	—	0,60

Количественное определение аминокислот проводилось колориметрическим методом. Интенсивность окрашивания нингидриновых комплексов аминокислот измерялась после перевода их в кадмиевый комплекс по несколько измененному методу Лиситского и Георгетта [14]. Для этого, после проведения реакции с нингидрином, участки бумаги с пятнами аминокислот мелко нарезали и окраску элюировали 4 мл 0,5%-ного раствора $CdCl_2$ в 40% этаноле в течение 2 часов при комнатной температуре. Интенсивность окраски измерялась на спектрофотометре СФ-4 при 510 м μ . Для менее точных измерений можно пользоваться фотоэлектрокалориметром (ФЭКН—54). Контролем служили элюаты участков хроматограмм, расположенных на уровне анализируемых пятен аминокислот. Для каждой отдельной аминокислоты получали предварительно стандартные кривые, поскольку интенсивность окрашивания для разных аминокислот различна. Кроме того, одна и та же

* Значения R_f аминокислот в смеси п-бутанол—уксусная кислота — вода (4:1:1) приведены после четырехкратного пропускания растворителя через бумагу

аминокислота может окрашиваться с различной интенсивностью в зависимости от условий каждого отдельного опыта (температура, влажность воздуха, степень удаления растворителей из бумаги и др.). Более точное измерение содержания аминокислот в исследуемом материале мы проводили не по стандартным кривым, а следующим образом: измерив предварительно с помощью стандартных кривых ориентировочные концентрации аминокислот в исследуемом материале, мы вновь проводили хроматографирование исследуемого образца параллельно в одной и той же камере и на одних и тех же полосках бумаги с тремя стандартными смесями чистых аминокислот. В одной из этих смесей содержание аминокислот соответствовало предварительно найденным ориентировочным концентрациям аминокислот в исследуемом материале, а концентрации во второй и в третьей смесях соответственно превышали и были ниже этой концентрации на 5%.

Содержание аминокислот в исследуемом материале определялось сопоставлением интенсивности окрашивания элюатов пятен аминокислот трех указанных смесей с интенсивностью окрашивания элюатов пятен соответствующих аминокислот в исследуемом материале.

Разница между концентрациями аминокислот в исследуемом материале и в смеси их чистых препаратов, при применении вышеуказанных трех стандартных смесей аминокислот, не превышает $\pm 3\%$. Поэтому количество каждой аминокислоты в одной из смесей наиболее близкое к ее содержанию в исследуемом материале принималось за концентрацию в последнем.

В табл. 2 приведены данные по содержанию аминокислот в альбумине, глобулине и глинах пшеницы, описанным выше способом.

Таблица 2

Содержание аминокислот в альбумине, глобулине и глинах пшеницы (сорта Эрицаеум)
(в мг на 100 мг абсолютного сухого веса белка)

Аминокислоты	Количество аминокислот		
	альбумин	глиадин	глобулин
Лизин	3,37	0,08	3,04
Гистидин	8,18	3,54	9,58
Аргинин	5,36	4,55	6,28
Фенилаланин	2,50	3,74	3,47
Триптофан	1,86	0,67	1,73
Валин	5,21	2,65	4,26
Лейцин	15,35	12,78	13,08
Изолейцин	2,61	0,94	3,19
Треонин	0,66	0,37	1,73
Метионин	3,96	0,69	2,67
Аланин	4,85	1,39	4,82
Тирозин	9,98	4,67	9,57
Аспарагиновая кислота	15,24	28,90	13,11
Глютаминовая кислота	7,73	7,61	9,35
Серин	13,71	9,19	12,21
Глицин	2,00	13,00	2,50
Пролин			

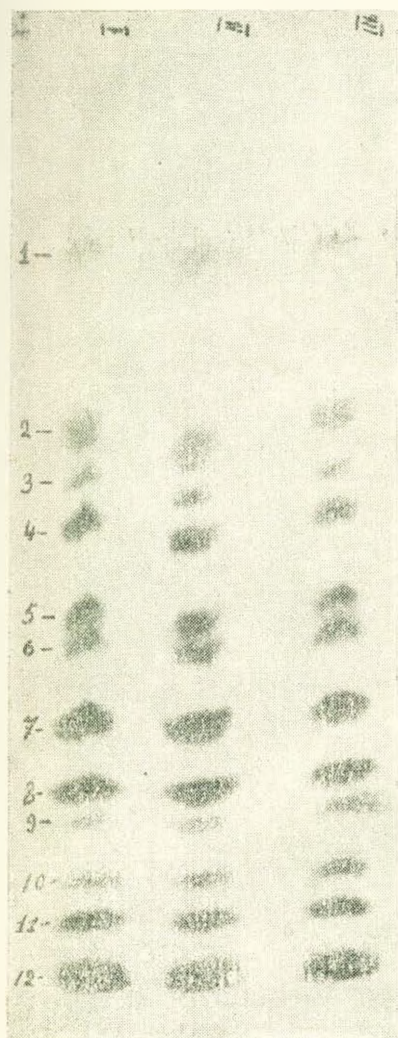


Рис. 3. Хроматограмма гидролизатов пшеничного альбумина в смеси *n*-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:1). 1—Цистин, 2—лизин, 3—гистидин, 4—аргинин, 5—аспарагиновая кислота—серин, 6—глицин, 7—глутаминовая кислота—треонин, 8—аланин, 9—пролин, 10—тирозин, 11—метьонин—валин, 12—фенилаланин—лейцин—изолейцин.

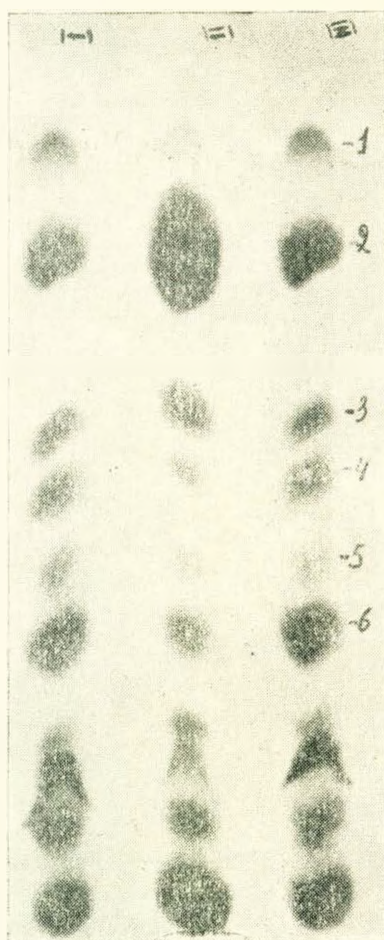


Рис. 4. Хроматограмма белковых гидролизатов пшеницы в забуференном феноле. I—Альбумин, II—гладин, III—глобулин, 1—Аспарагиновая кислота, 2—глутаминовая кислота, 3—серин, 4—глицин, 5—треонин, 6—аланин.



Рис. 5. Хроматограмма гидролизатов белков пшеницы в забуференном о-крезоле в камере без насыщения. 1—Глобулин, 11—глюадин, 1—Треонин, 2—аланин, 3—тирозин, 4—валин — метионин — изолейцин — лейцин — лейцин — фенилаланин — пролин.



Рис. 6. Хроматограмма гидролизатов белков пшеницы в забуференном о-крезоле в камере с насыщенными парами воды. 1—Глобулин, 11—глюадин, 1—Тирозин, 2—валин, 3—метионин, 4—изолейцин, 5—лейцин, 6—пролин, 7—фенилаланин.

Однако способ элюирования аминокислот с последующим их колориметрированием довольно трудоемок. Поэтому при массовых анализах лучше пользоваться предложенным Кейлом способом измерения на микрофотометре плотности негативного изображения пятен нингидриновых комплексов аминокислот на фотопленке и по площади кривых, соответствующих определенным аминокислотам, рассчитывать их содержание.

Следует отметить, что при определении содержания аминокислот как способом элюирования и последующего колориметрирования элюатов, так и фотометрическим способом, количество чистых аминокислот в стандартной смеси должно, возможно, ближе соответствовать их содержанию в исследуемом материале, взятом для нанесения на хроматограмму.

Кейл и др. концентрации чистых аминокислот в стандартной смеси подгоняли к их концентрациям в наносимом на хроматограмму анализируемого материала эмпирически.

Мы пользовались для этой цели вышеуказанным колориметрическим способом определения ориентировочного содержания аминокислот в элюатах, что позволяло быстро составить стандартные смеси чистых аминокислот с небольшими отклонениями в содержании отдельных аминокислот по сравнению с их содержанием в исследуемом материале.

Способ фотографирования хроматограмм на кинофотопленке на расстоянии 1,5 м в методе Кейла имеет свои недостатки. Размеры пятен на пленке получаются во много раз уменьшенными, а слабо окрашенные пятна или края пятен часто даже не получаются на пленке. Все это не позволяет получить правильные данные и уменьшает точность метода. Поэтому мы предлагаем другой способ фотографирования.

Для получения более точного и хорошего негативного изображения хроматограмм на пленке лучше фотографировать хроматограммы на небольшом расстоянии ширококамерным фотоаппаратом так, чтобы пятна аминокислот получались почти в натуральную величину. При фотографировании лучше всего пользоваться фотопленкой марки «Позитив» М. 3., с чувствительностью 1,4 единиц ГОСТа. После обработки пленки в проявителе (4 г метола, 8 г гидрохинона, 60 г сульфита (безводного), 60 г соды, 1 г бромистого калия в 1 л воды) в течение 3—4 мин. и закрепления, проводятся измерения плотности пятен на денситометре с широкой щелью. Сопоставляя измеренные планиметром площади кривых, полученных на денситометре для отдельных аминокислот в исследуемом материале и в смеси из чистых препаратов, определялось содержание аминокислот в исследуемом материале.

Совершенно справедливы указания Кейла на то, что пятна аминокислот, находящихся в комплексных соединениях с медью, фотографировать невозможно. Нужно добавить, что при этом имеет значение не только увеличение фона, но решающую роль здесь играет тот факт, что яркость окрашивания пятен, как показали наши наблюдения, после перевода их в медный комплекс, не позволяет отразить на пленке не-

большие количественные различия для разных пятен одной и той же аминокислоты. Нельзя также, как отмечает Кейл, фотографировать хроматограммы при проходящем через нее свете. Поэтому предложенная Денисовой [15] модификация фотографирования хроматограммы не может быть применена при количественных определениях аминокислот. Наши наблюдения показали, что при этом способе помимо указанных Кейлом недостатков в виде неравномерной сетки отражается структура бумаги, что при измерении на микрофотометре или денситометре дает искаженные результаты.

Указанным выше фотометрическим способом мы проводили определения содержания аминокислот в пшеничном альбумине (табл. 3).

Таблица 3

Содержание аминокислот в альбумине пшеницы сорта Галгаос (Дельфи), определенное фотометрическим методом

Аминокислоты	Количество нанесенных чистых аминокислот в мг	Площадь кривых пятен аминокислот, полученных на денситометре* в см ²		
		чистые аминокислоты**	пшеничный альбумин 0,3 мг	Разница в %
Лизин	8,3	2,60	2,70	+3,8
Гистидин	17,3	4,17	4,00	-4,1
Аргинин	23,3	5,30	5,10	-3,8
Треонин	6,2	2,37	2,28	-3,7
Аланин	11,5	3,10	3,19	+2,9
Валин	15,6	1,65	1,70	+2,7
Лейцин	48,7	3,00	2,96	-1,3
Изолейцин	13,3	1,60	1,63	+1,8
Фенилаланин	35,5	1,30	1,34	+3
Аспарагиновая кислота	44,0	2,40	2,31	-3
Глютаминовая кислота	25,0	0,90	0,89	-1,1
Серин				

Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что площади кривых, полученных на денситометре для пятен чистых аминокислот и соответствующих аминокислот в пшеничном альбумине, близко совпадают. Так как разница между площадями не превышает $\pm 4,1\%$, то количество чистых аминокислот в нанесенной смеси можно принять за количество этих аминокислот в 0,3 мг пшеничного альбумина.

Параллельно нами проводились также анализы содержания аминокислот в пшеничном альбумине способом элюирования пятен аминокислот, с последующим колориметрированием.

Сопоставляя данные, полученные способом колориметрического определения содержания аминокислот с данным фотометрическим мето-

* Измерения проводились на денситометре, сконструированном в нашем институте кандидатом технических наук М. С. Шипаловым.

** Площади кривых чистых аминокислот принимались за 100%.

да, можно сказать, что эти два способа по точности отличаются очень незначительно (табл. 4). Разница в результатах, полученных тем и другим способами, не превышает $\pm 2,4\%$. Следовательно, фотометрический способ может быть успешно применен для количественного определения аминокислот.

Таблица 4

Сравнение данных по содержанию аминокислот в альбумине из пшеницы сорта Галгалос (Дельфи), полученные колориметрированием элюатов пятен аминокислот и фотометрическим методом (в мг на 100 мг абсолютного сухого веса белка)

Аминокислоты	Содержание аминокислот		
	по колориметрированию элюатов пятен аминокислот*	фотометрическим методом	разница в %
Лизин	2,76	2,70	-2,1
Гистидин	6,75	6,85	+1,4
Аргинин	7,52	7,44	-1
Треонин	1,80	1,84	+2,2
Аланин	2,48	2,54	+2,4
Валин	4,83	4,90	+1,9
Лейцин } Изолейцин }	14,21	15,80	+1,1
Фенилаланин	2,76	2,82	+2,1
Аспарагиновая кислота	14,46	14,10	-2,4
Глутаминовая кислота .	13,50	13,16	-2
Серин	6,77	6,71	0

Предложенные нами изменения в методе хроматографического определения аминокислот на бумаге касаются разделения аминокислот при хроматографировании, колориметрического определения содержания аминокислот в их элюатах в виде нингидриново-кадмиевых комплексов и фотометрического определения количества аминокислот. При точном соблюдении всех вышеуказанных приемов, описанный нами метод количественного определения аминокислот может быть использован для быстрого определения содержания аминокислот с точностью $\pm 3-5\%$.

Приношу свою благодарность член-корреспонденту АН СССР Н. М. Сисакяну за проявленное при выполнении данной работы внимание.

Институт биохимии им. А. Н. Баха

Академии наук СССР

Поступило 17 VI 1958 г.

* Содержание аминокислот, определенное способом колориметрирования их элюатов, принимали за 100%.

1. Ս. ՄԱՐԿՈՍՅԱՆ

ԱՄԻՆՈՒԹՈՒՆՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ԹՂԹԱՅԻՆ
ԽՐՈՄԱՏՈԳՐԱՖԻԱՅԻ ՄԵԹՈԴԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Վերջին տարիների ընթացքում լաբորանտները կիրառվում է ամինոթթվաների որոշման թղթային խրոմատոգրաֆիայի մեթոդը: Վերջինս ամինոթթվաների որոշման ալլ մեթոդների համեմատությամբ ունի մի շարք առավելություններ: Նախ՝ որ նշված մեթոդով աշխատելիս հետազոտվող նյութի աննշան քանակն է ծախսվում (1—2 մգ սպիտակուց) և երկրորդ՝ ամինոթթվային լրիվ կազմի քանակական որոշման համար մի քանի անգամ ավելի քիչ ժամանակ է պահանջվում:

Սակայն, չնայած վերը նշված առավելություններին, ամինոթթվաների քանակական որոշման թղթային խրոմատոգրաֆիայի մեթոդը դեռ հետո է լրիվ կատարելագործված լինելուց և ունի իր թերի կողմերը: Օրինակ՝ միշտ չէ, որ ստացվում է ամինոթթվաների բավարար բաժանում խրոմատոգրաֆիայի ժամանակ: Նրանց նիսպիրինային կոմպլեքսի դոնատորումը զանազան պործոնների ազդեցության տակ փոփոխվում է և այլն:

Այդ իսկ պատճառով մեր աշխատանքի ընթացքում անհրաժեշտ եղավ մտցնել մի շարք փոփոխություններ և որոշ չափով կատարելագործել ամինոթթվաների որոշման թղթային խրոմատոգրաֆիայի մեթոդը:

Ամինոթթվաների լրիվ քանակական որոշման համար մենք օգտագործեցինք միակողմանի վարիչական թղթային խրոմատոգրաֆիայի մեթոդը: Ըստ որում ամինոթթվաների բավարար բաժանման համար նպատակահարմար է օգտագործել հետևյալ լուծիչները. 1. — բուտանոլ-քացախաթթվա-ջուր (4:1:1), 2. — ֆենոլ-եռման ջերմաստիճանը 181° (հազեցած ֆոսֆորային բուֆերով Pn 12 (1:1), 3. — օ-կրեզոլ եռման ջերմաստիճանը 191°) հազեցած ֆոսֆորային բուֆերով Pn 6,2 (1:1):

Օ-կրեզոլի օգտագործման դեպքում անհրաժեշտ է նաև ամբողջ խրոմատոգրաֆիայի թուղթը հազեցնել վերը նշված բուֆերով, իսկ ֆենոլի դեպքում միայն ալն տեղերը, որտեղ պետք է կաթեցվի հիդրոլիզատը:

Ճշգրիտ քանակական որոշման համար հետազոտվող նյութի հետ միասին անալիտի ենք ենթարկում նաև մաքուր ամինոթթվաների նախապես ստանդարտը կրերի միջոցով գտած մոտավոր քանակները:

Ամինոթթվաների նիսպիրինային կոմպլեքսի դոնատորման առավելագույն զարգացումից հետո նրանց լուծում ենք 0,5% CdCl₂ — 40% սպիրտային լուծույթի մեջ և գոհանվորման ինտենսիվությամբ չափում ենք սպեկտրոֆոտոմետրի միջոցով (Cφ-4) 510 mμ ալիքի վրա:

Մասնատրական անալիտի դեպքում ավելի նպատակահարմար է ամինոթթվաների որոշման Կելլի ֆոտոմետրիկ մեթոդը, միայն այս դեպքում խրոմատոգրամման անհրաժեշտ է նկարահանել ոչ մեծ հետավորությունից և հետագա չափումները կատարել դեխսիտոմետրի միջոցով:

Նկատի ունենալով վերը մատնանշված հանգամանքները, կարելի է ասել, որ նկարագրային թղթային խրոմատոգրաֆիայի մեթոդի միջոցով կարելի է բավականին մեծ ճշտությամբ ($3-5\%$) համեմատաբար կարճ ժամանակամիջոցում որոշել ամինոթթուների քանակը:

ЛИТЕРАТУРА

1. Блок Р., Лестранж Р., Швейг Р., Хроматография на бумаге. М, 1954.
2. Рогинский В. В., Бумажная хроматография. Успехи химии, т. 19, в. 4, 445 1950.
3. Пасхина Т. С., Биохимия, 19, 702—712, 1954.
4. Шемякин Ф. М., Мицловский Э. С., Романов Д. В., Хроматографический анализ. М, 1955.
5. Block J., Anal. Chem., v, 22, 10, 13027, 1950.
6. Gramer F., Papierchromatographie. 1953.
7. Hats J. M., Masek K., Papirova chromatographie. 1954, Praha.
8. Ермакова Е. А., Биохимия, т. 22, в. 3, 917, 1957.
9. Horn M., J. and Jones D. B., J. Biol. Chem., v 157, 1, 153 1945.
10. Acher R. and Fram ageot C., Jutisæ M., Bioch. et Biophys. Acta, v. 5, 81, 1950.
11. Mc Farren E. F. Anal. chem., v. 23, 1, 168, 1951.
12. Кэйл Б. Сборник чехословацких химических работников. (Химия), т. 5, в. 19. 1006, 1954.
13. Mc Farren E. F. and Mills M. A., Anal. Chem., v. 24, 4, 650, 1952.
14. Lissitzky S. et Georgette J., Bull. Soc. chim. biol., v. 37, 11, 1177, 1955.
15. Денисова А. А. Биохимия, т. 22, в. 4, 755, 1957.
16. Fisher F. C., and Dörfel H., Biochem Z., 324, 7, 544, 1953.