

I. CHMIELEWSKA, K. TOCZKO, Z. KANIUGA, I. SZUMIEL

## WYKORZYSTANIE PRZEZ ORGANIZM LUDZKI SKŁADNIKÓW PODANEGO DOŻYLNIE HYDROLIZATU BIAŁKOWEGO

### IV.\* WYDALANIE W MOCZU AMINOKWASÓW Z ZABLOKOWANĄ GRUPĄ AMINOWĄ\*\*

Z Katedry Biochemii Uniwersytetu Warszawskiego w Warszawie  
Kierownik: prof. dr I. Chmielewska

Dzięki dokładnie opracowanym metodom badań dobrze poznane są dzisiaj przesączanie, resorpcja i wydalanie poszczególnych aminokwasów wolnych w moczu. Znacznie mniej wiadomo w jakiej postaci wydalane są aminokwasy związane, oznaczane jako wolne po hydrolizie kwaśnej moczu. Zagadnienie to wydaje się interesujące: poznanie form związanych wydalanych aminokwasów może rzucić pewne światło nie tylko na procesy detoksykacji, lecz również na mechanizm ich aktywnego transportu. Wydaje się, że do tego celu można wykorzystać zjawisko przelewu nerkowego. Na podstawie wyników badań nad wydalaniem wolnych aminokwasów, wywołanym sztuczną hiperaminoacydemią [4, 5], można się spodziewać, że ilość aminokwasów związanych, wydalanych w moczu, wzrośnie w wyniku przelewu po zwiększeniu ich stężenia we krwi, przepływającej przez nerki. Wzrost taki mógłby być wywołany doustnym podaniem bogatego w białko pożywienia, lub dożylnym — hydrolizatu białka, w ilości znacznie przekraczającej normalne zapotrzebowanie azotowe.

Wyniki poprzednich badań [2, 3] sugerowały słuszność tego przypuszczenia. Porównanie wyników oznaczeń N-aminowego metodą kolorymetryczną miedziową bezpośrednio w moczu i po uprzednim wysuszeniu zalkalizowanej próby w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym wskazywało na to, że w warunkach suszenia uwalniają się związki, tworzące rozpuszczalne kompleksy z miedzią. Dobowe ilości wydalonego N-aminowego oznaczone metodą ninhydrynową (po wysuszeniu zalkalizowanego moczu) wyższe od ilości, oznaczanych bezpośrednio w moczu metodą kolorymetryczną miedziową wskazywały, że uwalniane związki,

\* Część III — Acta Biochim. Pol. 7, 429 (1960).

\*\* Praca subsydiowana częściowo przez Wydział VI P.A.N.

kompleksujące miedź zawierającą grupę aminową [3]. W związku z tym: zajęto się dokładniejszym badaniem składników kompleksujących miedź, wydalanych w moczu po dożylnym podaniu hydrolizatu białkowego, a uwalnianych z formy związanej w środowisku alkalicznym.

## CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

### *Badania kliniczne*

W przeprowadzonych badaniach czynnikiem wywołującym hiperaminoacydemię było dożylne wprowadzenie enzymatycznego hydrolizatu białka krwi bydłowej w ilości 1000 ml dobowo przy równoczesnej diecie o dużej zawartości białka. Badania kliniczne przeprowadzono na pięciu zdrowych mężczyznach w wieku lat 21—24. Doświadczenia trwały 5 dób, licząc początek każdej doby od godziny 9 rano. W 2, 3 i 4 dniu doświadczenia badani otrzymywali o godz. 9 rano dożylnie po 1000 ml hydrolizatu białkowego [1] metodą wlewań kroplowych (czas podawania 1,5—2,0 godzin). Mocz zbierano do naczyń szklanych, zawierających około 1 g tymolu i 50 ml toluenu i przechowywano w chłodni. Dobowe próby moczu konserwowano przez dodanie większej ilości toluenu (wystarczającej do pokrycia powierzchni moczu) i trzymano w temp. 0°. Oznaczanie N-aminowego przeprowadzono w średniej dobowej próbce moczu po stwierdzeniu nieobecności białka.

## METODYKA

Wolne  $\alpha$ -aminokwasy moczu oznaczano ninhydrinową metodą manometryczną *van Slyke'a*, *Hamiltona* i *Mc Fadyena* [6, 7] w aparacie *van Slyke'a — Thomasa* z magnetycznym mieszadłem.

Azot wolnych grup aminowych oznaczano kolorymetryczną metodą ninhydrinową *Yemma* i *Cockinga* na kolorymetrze Methrom E 1005, w kiuwetach o grubości 15 mm, stosując filtr nr 5 (pomarańczowy). Krzywą wzorcową sporządzano na podstawie oznaczeń N-aminowego w standardowym roztworze czystych aminokwasów.

Chromatografię bibułową aminokwasów przeprowadzono techniką wstępującą na bibule Whatman nr 1 w dwóch układach: I propanol — woda 7:3 v/v, II n-butanol — kwas octowy — woda 12:3:5. Do wywoływania chromatogramów stosowano 0,1% roztwór ninhydriny w acetonie, zawierającym 4% kwasu octowego oraz 0,3% roztwór izatynę w acetonie, zawierającym 4% kwasu octowego. Wywoływanie ninhydriną przeprowadzano w temperaturze pokojowej w ciągu 24 godzin, izatyną — w ciągu 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie w ciągu 5—7 minut w temperaturze 110°. Stosowano dwa układy wzorcowe: I histydyna, glicyna, treonina, tyrozyna, fenyloalanina, II cystyna, lizyna, arginina, kwas glutaminowy, tryptofan.

N-aminowy wolnych aminokwasów oznaczano bezpośrednio w moczu dobowym i po wysuszeniu prób moczu w środowisku alkalicznym.

N-aminowy wolnych grup aminowych oznaczano we frakcjach moczu dobowego (w wycieku i eluacie) uzyskanych w wyniku rozdzielania składników moczu na kolumnie z Amberlite IR-120, forma  $H^+$ , stosując dwie techniki (A i B). Technika A polegała na wysuszeniu w środowisku alkalicznym i następnym frakcjonowaniu prób moczu na kolumnie, technika B — na uprzednim rozfrakcjonowaniu prób moczu na kolumnie i następnym wysuszeniu uzyskanych frakcji w środowisku alkalicznym. Ten sposób postępowania pozwolił na stwierdzenie w jakiej frakcji znajdują się aminokwasy związane, uwalniane w czasie suszenia prób w środowisku alkalicznym, stosowanym w celu usunięcia amoniaku.

Do rozcieńczeń i wymywania frakcji z kolumny stosowano wodę destylowaną pozbawioną amoniaku przez przepuszczenie przez kolumnę z permutytu, forma  $H^+$ .

Wyniki ilościowych oznaczeń wyrażano w gramach N-aminowego w dobowej ilości moczu.

### Przygotowanie prób moczu do analiz

#### 1. Do bezpośredniego oznaczania N-aminowego wolnych $\alpha$ -aminokwasów.

2 ml przesączonego moczu odpipetowywano do naczynia reakcyjnego i przeprowadzano rozkład mocznika działaniem ureazy, w sposób opisany przez *Van Slyke'a*, *Hamiltona* i *McFadyena* [7], stosując jednak dwukrotnie większą (350 mg) ilość buforu fosforanowego o pH 6,2 ze względu na dużą zawartość mocznika w badanych moczach.

#### 2. Do oznaczania N-aminowego $\alpha$ -aminokwasów, uwalnianych w środowisku alkalicznym oraz N-aminowego wolnych grup aminowych techniką A.

2 ml przesączonego moczu zadawano 0,05 ml 18 N wodorotlenku sodowego i suszono w temperaturze pokojowej w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym. Suchą pozostałość rozpuszczano w 4 ml wody, zakwaszono 2N kwasem solnym do pH 5—6 i uzupełniano do 5 ml. Z otrzymanego roztworu 2 ml pobierano do oznaczenia N-aminowego wolnych  $\alpha$ -aminokwasów, postępując dalej w sposób, opisany w p. 1, oraz 2 ml do rozdzielania na kolumnie z Amberlite IR-120, forma  $H^+$ , przeprowadzonego w następujący sposób:

2 ml roztworu moczu wprowadzono na kolumnę z Amberlite IR-120 (forma  $H^+$ , frakcja 0,1—0,3 mm) o wymiarach  $9 \times 50$  mm. Po upływie 5—10 minut od wprowadzenia roztworu przemywano kolumnę około 45 ml wody destylowanej, uzyskany wyciek doprowadzano do pH 5—6 i uzupełniano wodą do 50 ml. Z tego roztworu pobierano 1 ml próby do oznaczeń N-aminowego. Związane na kolumnie amfolyty eluowano 25 ml około 2N wodorotlenku sodowego, a następnie 20 ml wody. Eluat doprowadzano początkowo stężonym, a następnie 1N kwasem solnym do pH 5—6 i dopełniano wodą do 50 ml. Zależnie od zawartości N-aminowego uzyskany roztwór rozcieńczano do badania dwu- lub pięciokrotnie i pobierano 1 ml próby do oznaczeń. Kolumnę regenerowano przez przepuszczenie 40 ml 2N kwasu solnego, a następnie 50 ml wody.

#### 3. Do oznaczania N-aminowego wolnych grup aminowych techniką B.

5 ml przesączonego moczu wprowadzano bezpośrednio na kolumnę z Amberlite IR-120, forma  $H^+$ . Kolumnę przemywano i eluowano jak w p. 2. Uzyskany eluat bez zubożenia dopełniano wodą do 50 ml. Z tego roztworu pobierano 2 ml i suszono w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym. Suchą pozostałość rozpuszczano w ok. 5 ml wody, doprowadzano 1N kwasem solnym do pH 5—6 i zależnie

od zawartości N-aminowego uzupełniano do 25 ml lub 50 ml. Wyciek doprowadzano 1N wodorotlenkiem sodowym do pH 5—6 i uzupełniono wodą do 50 ml. Z tego roztworu pobierano próby (1 ml) do bezpośredniego oznaczenia N-aminowego, lub też poddawano je suszeniu w środowisku alkalicznym. W tym celu 2 ml próbę alkalizowano 0,02 ml 18N wodorotlenku sodowego, suszono w eksykatorze próżniowym nad kwasem siarkowym, rozpuszczano w ok. 5 ml wody, doprowadzano roztwór 1N kwasem solnym do pH 5—6 i uzupełniano wodą do 25 ml lub 50 ml, zależnie od zawartości N-aminowego.

#### *4. Do rozdziału chromatograficznego aminokwasów uwalnianych w czasie suszenia w środowisku alkalicznym.*

4 ml wycieku z kolumny, otrzymanego w p. 3 alkalizowano 0,04 ml 18N wodorotlenku sodowego i suszono nad kwasem siarkowym w eksykatorze próżniowym. Pozostałość rozpuszczano w 4 ml wody, zakwaszono kwasem solnym do pH 5—6 i wprowadzano na kolumnę z Amberlite IR-120, forma H<sup>+</sup>. Zaadsorbowane amfolyty eluowano 30 ml 2N amoniaku. Eluat odparowywano do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°, suchą pozostałość rozpuszczano w 0,2 ml 60% alkoholu, zakwaszonego kwasem octowym do pH 3,0 i roztwór наносono na bibułę.

### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W celu sprawdzenia dokładności rozdziału i procentu odzyskania N-aminowego przy zastosowaniu kolumny z Amberlite IR-120, forma H<sup>+</sup> do adsorpcji amfolitów moczu przeprowadzono oznaczenia kontrolne. Do oznaczeń tych użyto jako standardów mieszaninę aminokwasów oraz hydrolizat enzymatyczny, stosowany do wlewań dożylnych. Wyniki oznaczeń (tab. 1) wykazały, że w stosowanych warunkach do wycieku nie przechodzą składniki, dające barwny test z ninhydriną, zaś w eluacie wykrywa się 94—99% N-aminowego wprowadzonego na kolumnę.

Odzyskanie N-aminowego po rozdziale na kolumnie prób normalnego moczu dobowego podane jest w tab. 2. W tym przypadku do wycieku przechodzi część składników, dających barwny test z ninhydriną, bowiem w warunkach rozdziału nie zatrzymuje się na kolumnie tauryna — zawsze obecna w moczu — oraz mogą przejść do wycieku niektóre kwaśne peptydy. Procent odzyskania (90,3—106,0) jest nieco niższy niż w przypadku mieszanin czystych aminokwasów, obserwuje się również większy rozrzut wyników, jednakże dokładność można uznać za wystarczającą do celów analizy moczu.

Zestawienie wyników analiz, przeprowadzonych manometryczną metodą ninhydrynową podane jest w tab. 3, zestawienie wyników uzyskanych kolorymetryczną metodą ninhydrynową — w tab. 4.

Jak widać z tab. 3 wysuszenie zalkalizowanego moczu, wydalonego w dniu kontrolnym (pierwszy dzień badań) nie wpływa na zmianę ilości wolnych  $\alpha$ -aminokwasów. Natomiast wysuszenie w tych warunkach moczu, wydalonego w dniach infuzji hydrolizatu białkowego powoduje wyraźny

przyrost ilości wolnych  $\alpha$ -aminokwasów. Wskazuje to, że w wyniku podania hydrolizatu przechodzą do moczu formy aminokwasów związanych, niestrawne na zimno w środowisku alkalicznym. Połączenia te nie ulegają

Tabela 1. Odzyskanie N-aminowego po rozdziale na kolumnie.  
Table 1. Recovery of the amino nitrogen in effluent and eluate.

Próba Sample	Nr No	N-aminowy; Amino nitrogen			% odzyskania Per cent of recovery
		wprowadzony introduced mg	odzyskany recovered mg		
			wyciek effluent	eluat eluate	
Hydrolizat kwaśny bia- łek krwi	1	0,292	0,00	0,279	95,9
	2	0,292	0,00	0,274	94,0
	3	0,584	0,00	0,564	96,5
	4	0,584	0,00	0,580	99,5
Hydrolizat białkowy enzymat. do wlewań dożylnych	1	0,238	0,00	0,232	98,7
	2	0,238	0,00	0,235	97,5
	3	0,476	0,00	0,471	98,9
	4	0,476	0,00	0,469	98,5

Tabela 2. Odzyskanie N-aminowego moczu po rozdziale na kolumnie (w g/dobę).  
Table 2. Recovery of the amino nitrogen of urine in effluent and eluate (g/day).

Nr próby No of sample	W moczu In urine	W wycieku In effluent	W eluacie In eluate	% odzyskania Per cent of recovery
1	0,31	0,07	0,24	100,0
2	0,38	0,07	0,30	97,4
3	0,32	0,07	0,22	90,6
4	0,24	0,05	0,17	91,6
5	0,32	0,07	0,21	90,3
6	0,23	0,04	0,17	91,3
7	0,28	0,07	0,23	106,0

rozkładowi w czasie przechowywania moczu (do 3 tygodni), ani w czasie kilkominutowego ogrzewania w pH 2,5 w temp. 100° (warunki oznaczania wolnych aminokwasów manometryczną metodą ninhydrynową), są natomiast alkalilabilne w warunkach nie wywołujących rozszczepienia wią-

Tabela 3. N-aminowy  $\alpha$ -aminokwasów (w g/dobę).  
 Table 3. Amino nitrogen of  $\alpha$ -amino acids (g/day).

Osobnik Subject	Dzień Day	Zywienie Feeding *	Objętość mocz Volume of urine ml	W świeżym mocz In fresh urine	Po suszeniu After drying	Uwalniany w cza- sie suszenia Liberated during drying
1	2	3	4	5	6	7
Z. O.	1	N	1440	0,33	0,33	0,00
	2	N+I	1810	0,44	0,55	0,11
	3	N+I	1620	0,41	0,53	0,12
	4	N+I	1150	0,29	0,42	0,13
	5	N	1560	0,22	0,32	0,10
D. J.	1	N	1260	0,15	0,15	0,00
	2	N+I	1540	0,38	0,51	0,13
	3	N+I	1870	0,29	0,42	0,13
	4	N+I	1220	0,19	0,37	0,18
	5	N	1100	0,09	0,14	0,05
Z. D.	1	N	780	0,21	0,21	0,00
	2	N+I	1080	0,30	0,49	0,19
	3	N+I	1170	0,37	0,51	0,14
	4	N+I	860	0,28	0,38	0,10
	5	N	600	0,13	0,15	0,02
S. G.	1	N	1750	0,27	0,26	0,00
	2	N+I	1540	0,30	0,49	0,19
	3	N+I	950	0,31	0,51	0,20
	4	N+I	1850	0,40	0,65	0,25
	5	N	1960	0,15	0,17	0,02
J. D.	1	N	900	0,17	0,17	0,00
	2	N+I	1020	0,25	0,42	0,17
	3	N+I	1280	0,27	0,46	0,19
	4	N+I	1780	0,30	0,51	0,21
	5	N	960	0,13	0,18	0,05

\* N = dieta o dużej zawartości białka.  
 protein rich diet.  
 I = infuzja 1000 ml hydrolizatu białkowego.  
 infusion of 1000 ml of the protein hydrolisate.

Tabela 4. N-aminowy, oznaczany metodą Yemmy i Cockinga (w g/dobę).  
 Table 4. Amino nitrogen, determined by the method of Yemm and Cocking (g/day).

Osobnik Subject	Dzień Day	Technika A Method A		Technika B Method B			Uwalniany w czasie suszenia Liberated during drying
		Wyciek Effluent	Eluat Eluate	Eluat Eluate	wyciek effluent		
					Przed susze- niem Before drying	Po suszeniu After drying	
1	2	3	4	5	6	7	8
Z. O.	1	0,19	0,37				
	2	0,19	0,67				
	3	0,15	0,80				
	4	0,10	0,57				
	5	0,13	0,33				
D. J.	1	0,07	0,21				
	2	0,11	0,68				
	3	0,09	0,67				
	4	0,08	0,54				
	5	0,05	0,17				
Z. D.	1	0,06	0,38				
	2	0,09	0,73				
	3	0,12	0,71				
	4	0,08	0,49				
	5	0,04	0,17				
J. D.	1			0,15	0,06	0,06	0,00
	2			0,25	0,11	0,37	0,26
	3			0,31	0,12	0,41	0,29
	4			0,29	0,10	0,41	0,31
	5			0,16	0,07	0,16	0,09

zań peptydowych, ani wiązania amidowego w kwasie hipurowym. Ilość uwolnionych  $\alpha$ -aminokwasów jest dość znaczna — wynosi w badanych przypadkach 0,10—0,25 g N-aminowego na dobę. Odpowiada to 30—60% ilości  $\alpha$ -aminokwasów wydanych równocześnie w postaci niezwiązanej.

W celu wykluczenia możliwości, że badane aminokwasy związane pochodzą z hydrolizatu białkowego, stosowanego do infuzji i zostały wyda-

lone jako składniki nieprzyswajalne przez organizm przeprowadzono oznaczenie wolnych  $\alpha$ -aminokwasów w hydrolizacie, wysuszonym w warunkach stosowanych do suszenia moczu. Oznaczenia te dały wyniki zgodne w granicach błędu pomiaru z wynikami uzyskanymi w oznaczeniach bezpośrednich.

W czasie stosowania techniki A do rozdziału składników moczu  $\alpha$ -aminokwasy uwolnione w opisanych warunkach są adsorbowane na kolumnie, a następnie przechodzą do eluatu. Są one oznaczane kolorymetryczną metodą ninhydrynową łącznie z obecnymi bezpośrednio w moczu związkami aminowymi, powodując zwiększenie się tej frakcji azotowej moczu. Z tego względu wartości N-aminowego w eluacie, otrzymanym techniką A (kolumna 4 tab. 4) mogą być porównywane tylko z wartościami N-aminowego  $\alpha$ -aminokwasów otrzymanymi po uprzednim wysuszeniu zalkalizowanej próby moczu (kolumna 6 tab. 3). Ma to istotne znaczenie, bowiem porównanie z ilością N-aminowego wolnych  $\alpha$ -aminokwasów, występujących bezpośrednio w moczu (kolumna 5 tab. 3) może dać błędne pojęcie o ilości wydalonych amfolitów, nie będących  $\alpha$ -aminokwasami (grupy aminowe peptydów,  $\beta$ -aminokwasy, aminy).

Ilość N-aminowego w wycieku z kolumny (tab. 4) jest znacznie mniejsza niż w eluacie i nie ulega wyraźnym zmianom w wyniku podania hydrolizatu białkowego. Infuzja hydrolizatu zwiększa natomiast 2—3-krotnie ilość N-aminowego w eluacie. Jest to związane ze zwiększeniem się ilości aminokwasów wolnych, wydalonych w wyniku „overflow” oraz wydalaniem aminokwasów związanych, uwalnianych w czasie przygotowania próby do analizy kolorymetryczną metodą ninhydrynową. Porównanie wartości N-aminowego podanych w kolumnie 4 tab. 4 (wolne grupy aminowe) z wartościami kolumny 6 tab. 3 (wolne aminokwasy) wskazuje, że oprócz wyżej wymienionych związków infuzja hydrolizatu zwiększa wydalanie i innych związków aminowych.

Rozdział na kolumnie moczu J. D., przeprowadzony techniką B pozwolił na stwierdzenie, że aminokwasy związane, uwalniane w czasie suszenia prób moczu w środowisku alkalicznym nie zatrzymują się na kolumnie, lecz przechodzą do wycieku, a zatem nie posiadają wolnej grupy aminowej. Analiza chromatograficzna uwolnionych aminokwasów wykazała obecność: cystyny, lizyny, histydyny, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, seryny, alaniny, proliny, waliny i fenyloalaniny.

Otrzymane wyniki pozwalają przypuszczać, że wszystkie typy aminokwasów mogą występować w moczu, wydalonym po podaniu hydrolizatu w alkalilabilnej formie związanej, jednakże wykrycie ich metodą chromatograficzną nie było możliwe ze względu na zbyt małe stężenie. Obec-



nie trudno jeszcze odpowiedzieć na pytanie, czy wykryte formy aminokwasów związanych są powstałymi w organizmie produktami detoksykacji, czy też formami aktywnymi, wydalonymi w wyniku „overflow”.

*И. Хмельска, К. Точко, З. Каниуга, И. Шумель*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ОРГАНИЗМОМ ВНУТРИВЕННО ВВЕДЕННОГО ГИДРОЛИЗАТА БЕЛКА

### *Содержание*

Установлено, что внутривенное введение белкового гидролизата здоровым, молодым мужчинам, содержащимся на высоко белковой диете, ведет к выделению с мочей нового вида соединенных аминокислот. Эти соединения не дают красочной реакции с нингидрином и не задерживаются на колонке с Amberlite IR-/20 форма H+. Во время приготовления пробы к колориметрическому анализу по нингидриновому методу (просушивание алкализированной мочи в комнатной температуре в вакууме) эти соединения разлагаются с образованием свободных  $\alpha$ -аминокислот. Количество  $\alpha$ -аминокислот, освобождающихся в этих условиях составляет 0,1—0,25 г  $N_{NH_2}$  в сутки (определение по методу Ван Слайка-Гамильтона), что соответствует 30—60% количества выделенных одновременно свободных  $\alpha$ -аминокислот.

На основании хроматографических методов установлено наличие следующих аминокислот, освобождающихся в вышеупомянутых условиях: аланин, цистин, фенилаланин, глицин, гистидин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лизин и пролин.

*I. Chmielewska, K. Toczko, Z. Kaniuga, I. Szumiel*

## UTILISATION OF INFUSED PROTEIN HYDROLIZATE BY THE HUMAN ORGANISM

### IV. Excretion to urine of N-blocked amino acids

#### *Summary*

It was found, that intravenous infusion of a protein hydrolisate to young, healthy men, who were kept on a protein-rich diet, causes the excretion to urine of inusually N-blocked  $\alpha$ -amino acids. These  $\alpha$ -amino acid derivatives do not react with ninhydrin and are not adsorbed on cation-exchange column (H<sup>+</sup> form). During preparation of the sample for a colorimetric analysis by the ninhydrin method (drying of the alkalized urine at room temperature in vacuum) these compounds undergo decomposition, yielding free  $\alpha$ -amino acids.

Quantity of these liberated  $\alpha$ -amino acids corresponds to 0,1—0,25 g of  $N_{NH_2}$  per day (determined by the *van Slyke-Hamilton* method). This represents 30—60% of the excreted simultaneously free  $\alpha$ -amino acids.

The following amino acids, liberated under the above given conditions were found chromatographically: alanine, aspartic acid, cystine, glycine, glutamic acid, histidine, lysine, phenyl-alanine, proline.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Bełżecka K., Chmielewska I.*: Acta Biochim. Pol., 1956, 3, 497.
2. *Chmielewska I., Bełżecka K., Raczyńska-Bojanowska K., Manicki J.*: Acta Biochim. Pol., 1958, 5, 419.
3. *Chmielewska I., Toczko K., Kaniuga Z., Manicki J.*: Acta Biochim. Pol., 1960, 7, 429.
4. *Doolan P. D., Harper H. A., Hutchin M. E., Shreeve W. W.*: J. Clin. Invest., 1955, 34, 1247.
5. *Doolan P. D., Harper H. A., Hutchin M. E., Alpen E. L.*: J. Clin. Invest., 1956, 35, 888.
6. *Van Slyke D. D., Dillon R. T., Mac Fadyen D. A., Hamilton P.*: J. Biol. Chem., 1941, 141, 627.
7. *Van Slyke D. D., Hamilton P., Mc Fadyen D. A.*: J. Biol. Chem., 1943, 150, 241.
8. *Yemm E. W., Cocking E. C.*: Analyst, 1955, 80, 209.

Otrzymano: 14. 1. 1961.

Adres autorów: Katedra Biochemii U. W., Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 6.