

Z Katedry Chemii Fizjologicznej Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Janina Opińska-Blauth

Janina OPIEŃSKA-BLAUTH i Zbigniew PRASAŁ

**Badania porównawcze nad oznaczaniem azotu aminowego
w płynach ustrojowych**

**Сравнительные исследования по определению аминокислотного азота
в жидкостях организма**

**Comparative Studies on the Determination of Amino Nitrogen
in Body Fluids**

Do oznaczeń azotu aminowego w moczu, przeprowadzanych dla celów badań klinicznych, stosowane są różne metody. Wszystkie znane metody, jak np. formolowa Sørensen'a (12), gazometryczne, oparte na klasycznej metodzie Van Slyke'a (15), kolorymetryczne z ninhydryną (8, 14, 19) i metody związane z tworzeniem kompleksów miedziowych (11, 13) są niedokładne. Błędy tych metod w odniesieniu do poszczególnych aminokwasów są niejednakowe i dlatego oznaczenia całkowitego azotu aminowego w mieszaninach mogą budzić zastrzeżenia. Ponadto, pewne trudności w przystosowaniu wyżej wymienionych metod do oznaczeń azotu aminowego w moczu sprawia obecność niektórych substancji towarzyszących, jak np. amoniaku, mocznika, soli i innych. W szczególności dane liczbowe, dotyczące azotu aminowego w moczu, podawane przez autorów, stosujących niejednakowe metody, różnią się znacznie między sobą.

Celem naszej pracy było przystosowanie jednej z powyższych metod do oznaczeń azotu aminowego w moczu w oparciu o badania porównawcze.

CZĘŚĆ DOSWIADCZALNA

Materiały:

a) aminokwasy wzorcowe: glicyna, α -alanina, lizyna, histydyna, tauryna, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, cystyna, asparagina, leucyna. Wszystkie preparaty firmy angielskiej Light.

b) mocznik, chlorek sodowy, chlorek amonowy, fosforan dwusodowy (czyste do analiz),

c) próbki moczków fizjologicznych.

Metody:

a) Pope Stevensa (11), b) Spier Paschera (13), c) Troll Cannana (14).

Aparatura: oznaczenia kolorymetryczne przeprowadzano w fotokolorymetrze MGF Havemanna.

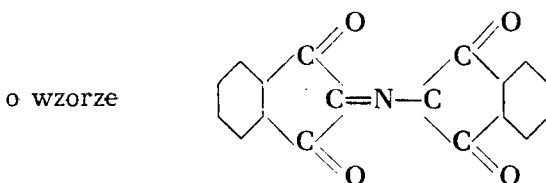
BADANIA WŁASNE

A. Modyfikacje wprowadzone do stosowanych metod

a. W metodzie Pope Stevensa przeprowadza się jodometryczne oznaczenia miedzi, związanej kompleksowo z aminokwasami. 1 ml 0,01 n tiosiarczynu odpowiada 0,28 mg azotu aminowego. Według naszej modyfikacji przeprowadza się oddzielenie kompleksu miedziowego od nadmiaru fosforanu nie na drzewce sączenia przez bibułę Wh. Nr 5, (oryginalna metoda) ale przy użyciu lejków Schott Jena G 4 pod zmniejszonym ciśnieniem. Zysk na czasie potrzebnym do oznaczenia wynosił około 2 godzin.

b. W metodzie Spier Paschera oznacza się miedź związaną kompleksowo z aminokwasami kolorymetrycznie przy pomocy reakcji barwnej z dwuetylo-dwutiokarbaminianem sodu. 1 μg Cu odpowiada 0,44 μg azotu aminowego. W miejsce stosowanego w oryginalnej metodzie do oznaczeń miedzi fotometru Pulfricha, przeprowadzono oznaczenia na fotokolorymetrze MGF Havemanna: filtr niebieski ($\lambda = 467 \text{ m}\mu$), naczynko o szerokości 1,5 cm, objętość końcowa płynu 20 ml. Dla celów badań seryjnych nadawały się lepiej oznaczenia w fotokolorymetrze zarówno ze względu na czas oznaczeń, jak i dokładność wyników.

c) W metodzie Troll Cannana oznacza się kolorymetrycznie barwnik dwuketohydrindylidenodwuketohydrindaminę (skrót DYDA)



otrzymany w reakcji α -aminokwasów z ninhydriną. Zamiast stosowanego w oryginalnej metodzie spektrofotometru Beckmana, przeprowadzono oznaczenia w fotokolorymetrze MGF Havemanna: filtr żółty, $\lambda = 575 \text{ m}\mu$, naczynko o szerokości 0,7 cm.

Tab. 1. B. Oznaczenia azotu aminowego w poszczególnych aminokwasach

Aminokwas	Pope Stevens				Spier Pascher				Troll Cannan			
	Teoret. NNH ₂ mg/l	Ilość prób	Zakres NNH ₂ mg/l	Błąd średniej %	Teoret. NNH ₂ mg/l	Ilość prób	Zakres NNH ₂ mg/l	Błąd średniej %	Teoret. NNH ₂ mg/l	Ilość prób	Zakres NNH ₂ mg/l	Błąd średniej %
Alanina	72	6	65—84	— 2,8	72	5	71—79	+ 2,7	48	6	40—45	—12,5
Kwas asparag.	41,1	4	37—41	— 8,3	42,1	5	38—48	+ 4,5	39	5	36—44	— 7,6
	1 N	6	92—131	— 7,8	114	5	100—122	— 4,4	nie tworzy związku DYDA			
1,5 N	6	92—131	—38,5	171	5	100—122	—36,2					
Asparagina	171	6	92—131	—38,5	171	5	100—122	—36,2	nie tworzy związku DYDA			
2 N	6	92—131	—53,0	228	5	100—122	—52,1					
Cystyna	228	6	92—131	—53,0	228	5	100—122	—52,1	nie tworzy związku DYDA			
1 N	5	152—163	— 7,4	23	5	21—23	— 4,3					
Glicyna	246	5	218—270	+ 2,0	246	4	229—281	— 2,8	24,6	5	21—46	—10,8
Kwas glutaminowy	95,2	4	84—96	— 5,7	95,2	6	88—110	+ 3,2	87	5	85—96	+ 8,0
	1 N	6	258—408	+71,2	195	7	290—403	+71,5	36	5	32—41	— 8,3
Hlistydyna	293	6	258—408	+13,9	293	7	290—409	+13,9	117	7	57—108	—11,1
	1,5 N	6	258—408	+13,9	293	7	290—409	+13,9	24,6	5	21—46	—10,8
Leucyna	390	6	258—408	—14,3	390	7	290—409	—14,2	156	7	57—108	—31,2
	1 N	5	148—198	+ 8,6	30	5	29—35	+ 6,7	15	6	13—19	+ 6,3
Lizyna	18	5	16—30	+ 5,5	91	5	75—92	— 5,4	18	5	14—23	+11,1
	1,5 N	5	16—30	—29,5	136	5	75—92	—36,7	27	5	14—23	—25,9
Tauryna	27	5	16—30	—29,5	182	5	75—92	—52,7	36	5	14—23	—44,4
	2 N	5	16—30	—47,2	182	5	75—92	—52,7	52,5	5	50—56	+ 6,6
nie tworzy połączeń kompleksowych z Cu ++												

Tab. 2. C. Oznaczenia azotu aminowego w mieszaninie

	Pope Stevens				Spier Pascher				Troll Cannan			
	Teoret. NNH_2 mg/l	Ilość prób	Zakres NNH_2 mg/l	Błąd średniej %	Teoret. NNH_2 mg/l	Ilość prób	Zakres NNH_2 mg/l	Błąd średniej %	Teoret. NNH_2 mg/l	Ilość prób	Zakres NNH_2 mg/l	Błąd średniej %
M. A.	656	6	540—731	-1,9	132	6	132—134	+1,4	66	5	46—70	+6,1
M. A. + n ocznik	656	6	617—670	-5,7	656	4	609—666	-2,2	66	4	68—75	+6,8
M. A. + sole	656	5	606—656	-5,5	656	4	595—668	-3,6	66	5	69—77	+7,5
M. A. + chlorek amonu	656	5	652—699	+6	132	6	134—138	+2,2	66	5	116—156	+9,6

M. A. — mieszanina aminokwasowa: glicyna (13,2 cz. w.), alanina (4,6 cz. w.), asparagina (5,4 cz. w.) lizyna (1,9 cz. w.), cystyna (1 cz. w.), leucyna (1,4 cz. w.), tauryna (16 cz. w.), kwas asparag. (1 cz. w.), kwas glutaminowy (5,3 cz. w.), histydyna (21,6 cz. w.).

mocznik — 30 g/l
sole NH_4Cl — 15 g NaCl/l + 3,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{l}$
 NH_4Cl — 3,8 g $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{l}$

U w a g a : objętość dodawanych roztworów substancji towarzyszących były równe we wszystkich 3 metodach pobranych do oznaczeń objętościom mieszanin aminokwasowych.

Tab. 3. D. Oznaczenia azotu aminowego w próbach moczu fizjologicznego

	Pope Stevens				Spier Pascher				Troll Cannan			
	Ilość próbki ml	Ilość oznaczeń czeń	Zakres oznaczeń NNH_2 mg/l	Srednio NNH_2 mg/l	Ilość próbki ml	Ilość oznaczeń czeń	Zakres oznaczeń NNH_2 mg/l	Srednio NNH_2 mg/l	Ilość próbki ml	Ilość oznaczeń czeń	Zakres oznaczeń NNH_2 mg/l	Srednio NNH_2 mg/l
Mocz I	2	6	228—414	251	0,5	7	220—235	224	0,2	7	221—240	231
Mocz I b	2	3	230—324	234	0,5	7	190—225	210	0,2	5	187—229	198
Mocz II	2	8	306—395	333	0,5	7	317—339	326	0,1	7	320—350	330
Mocz III	2	7	184—228	224	0,5	8	336—342	330	0,1	9	360—400	360
Mocz IV	2	7	229—430	360	0,5	8	251—280	260	0,2	7	340—500	352

fb — po usunięciu amoniaku z l.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Z metod stosowanych do oznaczeń azotu aminowego wymienić należy:

- A.** metodę miareczkową formolową Sørensen'a (12) i jej modyfikacje:
- a) mikromodyfikacja wg Northropa (9),
 - b) miareczkowanie acetonowe wg Linderstroma-Langa (7),
 - c) miareczkowanie w alkoholowym roztworze wg Willstättera i Waldschmidt-Leitza (18).
- B.** modyfikacje metod gazometrycznych i miareczkowych Van Slyke'a:
- a) gazometryczna z oznaczeniem azotu aminowego (15),
 - b) gazometryczna z oznaczeniem azotu aminowego wg Kendrick i Hank'e'go (6),
 - c) gazometryczna z oznaczeniem dwutlenku węgłowego wg Van Slyke'a, Dillona, Mc Fadyena i Hamiltona (16),
 - d) miareczkowa z oznaczeniem dwutlenku węgłowego wg Van Slyke'a, Mc Fadyena i Hamiltona (17).
- C.** metody kolorymetryczne z β -naftochinonem:
- a) wg Moora i Steina (8),
 - b) wg Troll Cannana (14),
 - c) wg Yemma i Cockinga (19).
- D.** metody kolorymetryczne z β -naftochinonem:
- a) wg Folina (2).
- E.** metody kompleksów miedziowych:
- a) miareczkowa Pope Stevensa (11),
 - b) kolorymetryczna Spier Paschera (13).

Metody formolowe wg Sørensen'a są obarczone błędem niejednakowym w stosunku do poszczególnych aminokwasów. W odniesieniu do całkowitego azotu otrzymuje się z argininy i tryptofanu 50%, z histydyny 16,6%, a z proliny i hydroksyproliny 100%. Amoniak i niektóre sole, w szczególności fosforany wpływają wyraźnie na wyniki oznaczeń.

W metodach gazometrycznych Van Slyke'a i ich modyfikacjach uzyskuje się dla wszystkich aminokwasów monoamino-monokarboksylowych i mono-amino-dwukarboksylowych 100% azotu z wyjątkiem tryptofanu (50%). Z aminokwasów zasadowych arginina reaguje w 25%, lizyna w 100% w odniesieniu do całkowitego azotu. Prolina i hydroksyprolina nie wchodzi w reakcję. Glikokol daje 103%, a cystyna 109% wartości teoretycznej. Wszystkie metody gazometryczne, zarówno te, w których oznacza się azot, jak i te, w których oznacza się dwutlenek węgłowy, są kłopotliwe w wykonaniu, wymagają precyzyjnej aparatury szklanej i większego zestawu odczynników. W przypadku stosowania powyższych metod do oznaczania azotu aminowego w moczu konieczne jest uprzednie usunięcie mocznika (10).

Metody kolorymetryczne znajdują obecnie szersze zastosowanie w badaniach seryjnych klinicznych, ze względu tak na nieskompliko-

waną aparaturę, jak i szybkość oznaczeń. Wyniki otrzymywane przy pomocy metod kolorymetrycznych nie ustępują pod względem dokładności innym metodom. Według Trolle i Cannana wszystkie aminokwasy z wyjątkiem tryptofanu i lizyny reagują ilościowo. Na niekorzyść tej metody, w zastosowaniu do materiału biologicznego, przemawia znaczny wpływ amoniaku. Według powyższych autorów amoniak bierze udział w reakcji tworzenia barwnika DYDA w 29%. Natomiast inne składniki występujące w moczu i krwi, jak mocznik, kreatyna, kreatynina, kwas moczowy, nie mają wpływu na wyniki oznaczeń.

Metoda kolorymetryczna Folina z β -naftochinonem nie znalazła szerszego zastosowania dla oznaczenia azotu aminowego w materiale biologicznym, ponieważ błąd przekracza 30%. Według Antener, opracowana dla celów klinicznych, mikrometoda jest korzystna z tego względu, że może być przeprowadzana w bardzo niewielkiej ilości materiału np. 0,1 ml krwi (1).

O różnicach w dokładności poszczególnych metod, stosowanych do oznaczeń azotu aminowego świadczy zestawienie wyników badań wg Hinsberga (5) (Tab. 4).

Tabela 4

Azot aminowy w mg %			
wg O. Folina	gazometrycznie	miareczkowanie acetonowe	miareczkowanie formolowe
5,8	13,1	11,1	11,8
7,4	15,7	14,5	11,8
4,8	12,4	14,3	10,9

W metodach kompleksów miedziowych z aminokwasami oznacza się azot aminowy na drodze pośredniej. Miedź związaną w kompleksie aminokwasowym oznacza się bądź jodometrycznym miareczkowaniem (Pope Stevens) bądź kolorymetrycznie z dwuetylodwutiokarbaminianem (Spier Pascher). Niewielka rozpuszczalność niektórych kompleksów, jak cystyny, metioniny, tryptofanu, leucyny i fenyloalaniny powoduje niedokładność oznaczeń w obu metodach. Mimo tych trudności metody te mają wyższość nad poprzednio opisanymi, ponieważ mogą być stosowane do oznaczeń proliny i hydroksyproliny a ponadto lepiej nadają się do oznaczeń azotu aminowego w moczu i surowicy, ze względu na nieznaczny wpływ składników towarzyszących na wyniki oznaczeń. Dlatego do oznaczeń porównawczych w moczu zastosowano obie metody miedziowe i jedną z modyfikacji metody ninhydrynowej (Troll Cannana), dość często cytowaną przez innych autorów.

Oznaczenia porównawcze przeprowadzono dla tych aminokwasów, które występują normalnie w moczu fizjologicznym. Nasze badania wstępne wykazały, że optymalny zakres stężeń aminokwasów wynosi dla metody: Pope Stevensa 7—20 mg N, Spier Paschera 0,05—0,5 mg N i Troll Cannana 0,005—0,01 mg N.

W odniesieniu do oznaczanych indywidualnych aminokwasów błędy obu metod miedziowych wahały się w granicach 2—13%, a w metodzie Troll Cannana 6—12%. Dla aminokwasów zasadowych, jak np. histydyny, najmniejszy błąd dla wszystkich metod otrzymuje się przy uwzględnieniu 1,5 atomu N, a dla lizyny tylko 1 atomu azotu. Tauryna nie tworzy kompleksu miedziowego lecz daje się ją oznaczać w metodzie Troll Cannana. Asparagina podobnie do proliny i hydroksyproliny nie daje w metodzie ninhydrynowej niebieskiego barwnika oznaczonego kolorymetrycznie lecz tworzy barwnik czerwony. W metodach miedziowych najmniejszy błąd wypada przy uwzględnieniu jednego tylko azotu, ponieważ azot amidowy nie wchodzi w reakcję. Według Pope Stevensa — nadmiar któregoś z aminokwasu, tworzącego kompleks łatwo rozpuszczalny np. glicyny, w mieszaninie umożliwia otrzymanie dobrych wyników nawet w obecności aminokwasów, dających kompleksy trudno rozpuszczalne. Mocz nadaje się szczególnie pod względem składu aminokwasowego dla metod miedziowych z powodu znacznej zawartości glicyny.

Nasze doświadczenia na mieszaninach aminokwasowych, w których poszczególne aminokwasy znajdowały się w podobnym stosunku ilościowym jak np. w moczu, dały doskonale wyniki szczególnie dla metod miedziowych (tab. 2). W metodzie Pope Stevensa błąd średnio wynosił —1,9%, Spier Paschera + 1,4%, Troll Cannana + 6,1%. Na korzyść metod miedziowych w zastosowaniu do moczu przemawia i to, że wpływ mocznika, scli i amoniaku jest stosunkowo nieznaczny. Natomiast przy zastosowaniu metody Troll Cannana amoniak musi być z roztworu całkowicie usunięty.

Tabela 5

Azot aminowy w mg/l			
Mocz Nr	Oznaczenie gazometr. przez CO ₂	Oznaczenie gazometr. przez N ₂	Miareczkowanie formalowe
1	98	118	127
2	177	176	254
3	174	236	330
4	139	168	191

Zakres zawartości azotu aminowego w moczu, oznaczanego przez wielu autorów różnymi metodami, waha się w dość szerokich granicach. (Van Slyke, Mc Fadyen i Hamilton, tab. 5).

Inni autorzy podają niższe zawartości azotu aminowego w moczu normalnym u dorosłych np.: Hawk (4) 0,2 g N_{NH_2} w dobowej ilości moczu, Antener (1) 125 mg N_{NH_2} (11) metodą Folina, Harris (3) 120 mg αN_{NH_2} (24 godz.).

W naszych badaniach, przeprowadzonych porównawczo trzema metodami wykazano, że wahania między poszczególnymi wynikami azotu aminowego w tym samym moczu są duże w metodach Pope Stevensa i Troll Cannana (od 40 do 180 mg/l). Natomiast w metodzie Spier Paschera różnice te wahają się tylko w granicach 6—35 mg/l (tab. 3). Wyniki średnie azotu aminowego w mg/l z 5 prób moczków dały: dla Pope Stevensa 280 mg/l, dla Spier Paschera 270 mg/l, dla Troll Cannana 288 mg/l.

Nieco wyższe wartości azotu aminowego, otrzymane w metodzie Troll Cannana, wynikają prawdopodobnie z wpływu amoniaku, który nie był usuwany.

Wyniki naszych badań uzasadniają pogląd, że metoda Spier Paschera spośród wszystkich dotychczas znanych metod może najlepiej odpowiadać dla oznaczeń azotu aminowego w moczu ponieważ a) niewielkie ilości próby eliminują wpływ substancji towarzyszących, b) metoda jest nieskomplikowana, c) ilość odczynników niewielka, d) czas

Tab. 6. Porównawcze zestawienie wyników oznaczeń N_{NH_2}

	M e t o d y		
	Pope Stevens	Spier Pascher	Troll Cannan
Ilość ml próbki	1 — 5	0,5 — 1	0,1 — 0,5
Optymalny zakres stężeń w mg N_{NH_2}	7 — 20	0,05—0,5	0,005—0,01
Błąd średni	— 1,9%	+ 1,4%	+ 6,1%
Dokładność	± 5,6%	± 2,0%	± 2,0%
Wpływ amoniaku	+ 7,9%	+ 0,8%	+ 90%
Wyniki średnie N_{NH_2} w mg/l w moczu	280	270	288
Różnice N_{NH_2} w mg/l w tym samym moczu	40 — 180	6 — 35	40 — 180

oznaczeń 1 serii (10 prób) do 2 godzin, e) powtarzalność wyników dobra, f) dokładność metody $\pm 2\%$.

PISMIENNICTWO

1. Antener J.: Schweiz. Med. Wchschr. **83**, 425, 1953, 2. Folin O.: J. Biol. Chem. **51**, 377, 1922, 3. Harris H.: 3-ème Congrès International de Biochimie, Bruxelles Les rapports **34**, 1955, 4. Hawk B. P., Summerson H. W.: Practical Physiological Chemistry, J. E. A. Churchill Ltd. 721, London 1947.
5. Hinsberg K., Lang K.: Med. Chemie, **800**, Urban i Schwarzenberg, München 1957, 6. Kendrick A. B., Hanke M. E.: J. Biol. Chem. **117**, 161, 1937, 7. Linderstrom-Lang K.: Z. Physiol. Chem. **173**, 32, 1927, 8. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. **176**, 367, 1948, 9. Northrop J. H.: J. Gen. Physiol. **9**, 767, 1926, 10. Peters i Van Slyke: Quantitative Clinical Chemistry **II**, 398, The Williams i Wilkins Company, Baltimore, 1932, 11. Pope Co. G., Stevens M. F.: Biochem. J. **XXXIII**, 1070, 1939, 12. Sörensen S. P. L.: Biochem. Z. **7**, 45, 407, 1907, 13. Spier H. W., Pascher G.: Z. Physiol. Chem. **296**, 147, 1954, 14. Troll W., Cannan R. K.: J. Biol. Chem. **200**, 803, 1953, 15. Van Slyke D.: J. Biol. Chem. **83**, 425, 1929, 16. Van Slyke D., Dillon R. T., Mc Fadyen D. A., Hamilton P. B.: J. Biol. Chem. **141**, 627, 1941, 17. Van Slyke D., Mc Fadyen D. A., Hamilton P.: J. Biol. Chem. **141**, 671, 1941, 18. Willstätter R., Waldschmidt-Leitz E.: Berichte Dtsch. Chem. Ges. **54**, 2988, 1921, 19. Yemm E. W., Cocking E. C.: Analyst. **80**, 209, 1955.

РЕЗЮМЕ

Авторами произведены сравнительные определения аминокислотного азота тремя методами: иодометрическим методом медных комплексов по Попе Стивенсу, колориметрическим методом Шпир Пашера и нингидриновым (колориметрическим) методом Тролля Каннана для некоторых выделенных аминокислот, в аминокислотных смесях и в моче.

В исследованиях смесей учитывалось влияние некоторых элементов, выступающих в моче. Для определения аминокислотного азота в моче, наиболее пригодным, по мнению авторов, является метод Шпир Пашера, так как дает небольшую лишь ошибку (около 2%), а повторяемость результатов по сравнению с другими методами гораздо лучше. Колебания количеств аминокислотного азота в тех же пяти пробах составляли лишь 6—35 мг/л, в то время как колебания в определениях полученных по методам Попе Стивенса и Тролля Каннана оказались гораздо выше (40—180 мг/л). В пользу этого метода для определения аминокислотного азота в моче говорит еще небольшое влияние главных составных элементов имеющих в моче, как мочевины, солей аммиака. При применении других, всеми приня-

тых методов необходимым является удаление мочевины и аммиака из подвергнутых исследованию проб мочи.

Простота метода, небольшое количество реактивов, маленькое количество материала (0,5 мл мочи), короткий срок произведения исследования (10 проб в течение 2 часов), выделяют этот метод, как самый лучший для определений аминокислотного азота в моче.

S U M M A R Y

The comparative determination of amino nitrogen in amino-acid mixtures, urine and some individual amino-acids was calculated by the three following methods: the copper complex iodometric method of Pope and Stevens, the colorimetric method of Spier and Pascher and the ninhydrin (colorimetric) method of Troll and Cannan.

The effect of some components of urine was also taken into consideration. In our opinion, the method of Spier and Pascher is the most suitable for the determination of nitrogen in urine. Error ascribable to the method is small (approximately 2 per cent) and the reproducibility of results is better, as compared with other methods. Differences in the amount of amino nitrogen in 5 of the same samples examined by Spier and Pascher's method ranged from 6 to 35 mg/l. Fluctuations in the amount of amino nitrogen in the same samples examined by the method of Pope and Stevens and Troll and Cannan were greater and ranged from 40 to 180 mg/l. The method of Spier and Pascher is more suitable for the determination of amino nitrogen in urine since the influence of some constituents contained in urine, e. g. urea, salts and ammonia, is small. To determine amino nitrogen by the majority of the other commonly used methods, urea and ammonia should be removed.

The colorimetric method of Spier and Pascher is very simple, requires a small set of reagents, a small quantity of material (0.5 ml of urine) and little time (10 samples can be tested within 2 hours). It is, therefore, one of the most suitable methods for the determination of amino nitrogen in urine.