

**FUJIFILM****Wako**

Code No. 295-78901 (700 Tests)

For Research Use Only

## LabAssay™ Ammonia

< Modified Fujii-Okuda Method >

**For Research Use Only Not for Diagnostic Use****[Introduction]**

Ammonia is converted to urea in the urea cycle and excreted. LabAssay™ Ammonia is the reagent kit for assay of ammonia based on a colorimetric method using the Berthelot reaction. This kit is used for the quantitative determination of ammonia in mouse, rat and human blood. It is a simultaneous multi-sample assay format using a microplate, but measurements can also be made using a test tube.

**[Kit Contents]**

(1)	Deproteinizing Reagent ( Sodium Tungstate Dihydrate Phosphoric Acid	100mL	1 vial
(2)	Chromogen Reagent A ( Phenol Sodium Pentacyanonitrosylferrate(III) Dihydrate	50mL	1 vial
(3)	Chromogen Reagent B ( Potassium Hydroxide	25mL	1 vial
(4)	Chromogen Reagent C ( Potassium Carbonate Sodium Hypochlorite	50mL	1 vial
(5)	Ammonia Standard Solution (NH <sub>3</sub> - N 400 µg/dL)	15mL	1 vial
(6)	Dilute Solution for Standard	20mL	1 vial

**[Materials and apparatuses to be prepared]****(For microplate method)**

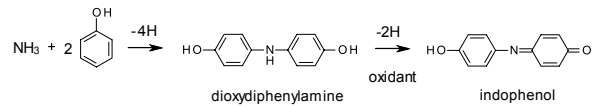
- 96wells microplate (transparent type)
- Micropipette
- Incubator maintaining at 37°C
- Plate mixer\*
- Microplate reader with a 630nm wavelength filter.  
(\* If the microplate reader is not equipped.)

**(For test tube method)**

- Test tube or microtube
- Pipette
- Incubator maintaining at 37°C
- Spectrophotometer with a 630nm wavelength filter

**[Principle of the assay]**

The Deproteinizing Reagent deactivates the enzymes and removes the components that inhibit color reaction in a sample. After adding Deproteinizing Reagent to a sample and centrifuging, add Phenol, Sodium Pentacyanonitrosylferrate(III) Dihydrate, and Sodium Hypochlorite to the supernatant. The indophenol blue pigment is obtained by the following schematic reaction. The amount of ammonia contained in the sample is determined by measuring the absorbance of the blue color.



※Sodium pentacyanonitrosylferrate(III) digydrate acts as catalyst

**[Preparation of reagents to be used]**

Before the measurement, transfer the required reagents to tubes and adjust the reagents to the following temperatures.

- Return Ammonia Standard Solution, Deproteinizing Reagent, and Dilute Solution for Standard to room temperature\*.
- Incubate Chromogen Reagent A, B, and C at 37°C for an hour.

\* Room temperature : 20~25°C

**(1) Standard solution (Microplate method)**

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Ammonia Standard Solution	Dilute Solution for Standard	Concentration
1	50 µL	150 µL	100 µg/dL
2	100 µL	100 µL	200 µg/dL
3	150 µL	50 µL	300 µg/dL
4	undiluted	-	400 µg/dL

**(2) Standard solution (Test tube method)**

Standard solution is prepared by dilution of the provided Standard.

No.	Ammonia Standard Solution	Dilute Solution for Standard	Concentration
1	200 µL	600 µL	100 µg/dL
2	400 µL	400 µL	200 µg/dL
3	600 µL	200 µL	300 µg/dL
4	undiluted	-	400 µg/dL

**[Procedure]**

Before the measurement, transfer the required reagents to tubes and adjust the reagents to the following temperatures.

- Return Ammonia Standard Solution, Deproteinizing Reagent and Dilute Solution for Standard to room temperature\*.
- Incubate Chromogen Reagent A, B and C at 37°C for an hour.

\* Room temperature : 20~25°C

(1) Assay in a microplate

Perform the assay in the wells according to the following table scheme.

	Test	Standard	Blank
An experiment can be conducted in a microtube			
Deproteinizing Reagent	Deproteinizing reagent : Sample = 4 : 1 (v/v)	Deproteinizing reagent : Standard solution = 4 : 1 (v/v)	70 $\mu$ L
Sample			–
	Mix well. Centrifuge 5000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, for 15min. Subsequent operations should be performed in the wells.	Mix well. Subsequent operations should be performed in the wells.	
	Supernatant 70 $\mu$ L	Mixed solution 70 $\mu$ L	–
Chromogen Reagent A	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L
Chromogen Reagent B	35 $\mu$ L	35 $\mu$ L	35 $\mu$ L
Chromogen Reagent C	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L	70 $\mu$ L
After adding each reagent to a microplate, mix well and incubate at 37 $^{\circ}$ C, for 20min. Mix well, then let stand at room temperature* for 30min. Mix well, then measure the absorbance of the test sample and standard solution at 630nm with the blank as the control.			

\* Room temperature : 20 ~ 25  $^{\circ}$ C

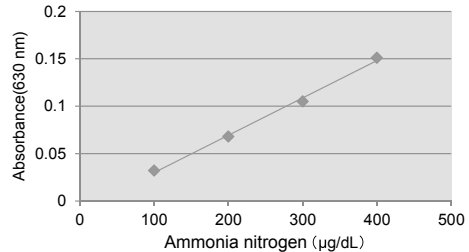
(2) Assay in a test tube

Perform the assay in the tubes according to the following table scheme.

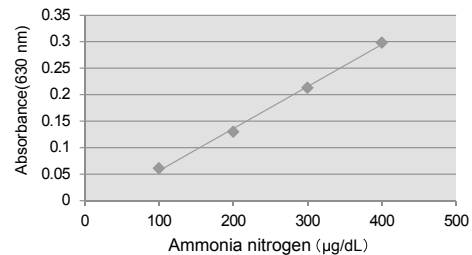
	Test	Standard	Blank
Operations should be performed in the micro tubes.			
Deproteinizing Reagent	Deproteinizing reagent : Sample = 4 : 1 (v/v)	Deproteinizing reagent : Standard solution = 4 : 1 (v/v)	800 $\mu$ L
Sample			–
	Mix well. Centrifuge 5000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, for 15min.	Mix well.	
	Transfer the supernatant (800 $\mu$ L) to another tube.	Transfer mixed solution (800 $\mu$ L) to another tube.	–
Chromogen Reagent A	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L
Chromogen Reagent B	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L	400 $\mu$ L
Chromogen Reagent C	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L	800 $\mu$ L
After adding each reagent to a tube, mix well and incubate at 37 $^{\circ}$ C, for 20min. Mix well, and place in water to cool (20 ~ 25 $^{\circ}$ C) for 30min. Mix well, then measure the absorbance of the test sample and standard solution with the blank solution as the control. Spectrophotometer : 630nm			

[Standard curve]

(1) Assay in a microplate



(2) Assay in a test tube method



[Performance]

(1) Sensitivity (Assay in a test tube method)

- The absorbance is 0.010 to 0.070, when measuring purified water as a sample.
- The absorbance is 0.200 to 0.370, when measuring 400  $\mu$ g/dL ammonia as a sample.

(2) Specificity

- The ammonia concentration is less than  $\pm$  35%, when measuring the known concentration of control blood as a sample.

[Usage Notes]

(1) Sample

- Ammonia in whole blood increases at room temperature. Therefore, collect the blood and transfer to test tubes or microtubes that contain Deproteinizing Reagent and centrifuge the samples to mix as quickly as possible.
- Store the supernatant on ice or at 2 ~ 10  $^{\circ}$ C and measure the sample within an hour.
- Do not use anticoagulants such as heparin and double oxalate.
- Amino acid preparations can cause a slightly negative effect on the assay.
- Amino acids in the blood may affect the assay.

(2) Notes on the assay

- Do not use the reagents described above in any procedures other than those described herein. Performance cannot be guaranteed if the reagents are used in other procedures or for other purposes.
- Operate the measurement apparatuses according to operator's manuals under appropriate conditions. Consult the apparatus manufacturer for details.

- Keep the provided reagents under the indicated conditions before the expiration.
- Do not use reagents, which were frozen in error. Such reagents may give false results.
- After opening the reagents, it is recommended to use them immediately. The opened vials should be capped and kept under the specified conditions.
- Do not use the containers and other materials in the package for any purpose other than those described herein.
- Reagents which are kept open for a long time cause dispersion of the measured values to absorb the ammonia. The opened vials should be capped and store at 2~10°C.
- Avoid exposing reagents to direct sunlight during operation.
- Do not use the reagents at other reaction temperatures and reaction times other than described herein.
- Wash the instruments with a weak alkaline solution. Wash them with tap water. Rinse them well with deionized water. Tap water and distilled water may contain a lot of volatile ammonium salts. Pay attention to washing of experimental instruments.
- When collecting the supernatant after centrifuging, pay attention not to mix with suspended matter. Suspended matter may cause dispersion of the measured values.
- This kit is for research use only. Not for diagnostic use.

### (3) Safety precautions

- If reagents come into contact with the mouth, eyes, or skin, immediately wash with a lot of water. Consult a physician if necessary.
- Deproteinizing Reagent is an acid solution which is less than pH 3.
- Chromogen Reagent B and C are alkaline solutions which are more than pH 11.
- A pipette with a safety pipette filter should be used.

### (4) Waste

- The waste should be processed appropriately according to the law.
- Chromogen Reagent A contains 0.015% Sodium Pentacyanonitrosylferrate(III) Dihydrate and 40g/L Phenol.
- All the devices including, reagents and vials, that come into contact with the specimen should be considered potentially infectious.

**Expiration date** : 18 months after the manufacture

**Storage** : Store at 2~10°C in the dark.

**Package** : 700 tests

## FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : + 81-6-6203-3741  
Facsimile : + 81-6-6201-5964  
http://www.wako-chem.co.jp

### FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road  
Richmond, VA 23237  
U.S.A.

Telephone : + 1-804-271-7677  
Facsimile : + 1-804-271-7791  
http://www.wakousa.com

### FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggenstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany

Telephone : + 49-2131-311-0  
Facsimile : + 49-2131-311100  
http://www.wako-chemicals.de

コード No. 295-78901 (700 回用)

## 研究用試薬

# ラボアッセイ™ アンモニア

< 藤井・奥田法変法 >

**試験研究用試薬であり体外診断用に用いることはできません**

### 〔はじめに〕

生体内で産生されたアンモニアは、肝臓の尿素サイクルによって尿素に変換され尿中に排泄されます。

本品は、ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウムを触媒として、フェノール、次亜塩素酸を用いたベルテロー反応を利用した比色法に基づくアンモニア測定試薬です。マウス、ラットおよびヒト血液中のアンモニア量の測定に用いることができます。マイクロプレート法および手法での測定も可能です。体外診断用に用いることはできません。

### 〔キット内容〕

(1)	除たん白試液 ( タングステン酸ナトリウム リン酸を含有	100mL	1本
(2)	発色試液 A ( フェノール ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウム 2水和物	50mL	1本
(3)	発色試液 B ( 水酸化カリウム	25mL	1本
(4)	発色試液 C ( 炭酸カリウム 次亜塩素酸ナトリウムを含有	50mL	1本
(5)	アンモニア標準液 (NH <sub>3</sub> -N 400 μg/dL)	15mL	1本
(6)	標準液用希釈液	20mL	1本

### 〔キット以外に必要な器具・器材〕

(マイクロプレート法の場合)

- 96ウェルの透明マイクロプレート
- マイクロピペット
- 恒温槽 (37°C)
- プレートミキサー\*
- マイクロプレートリーダー (630nm吸光フィルター)  
(\* : マイクロプレートリーダーの機種によっては不要です。)

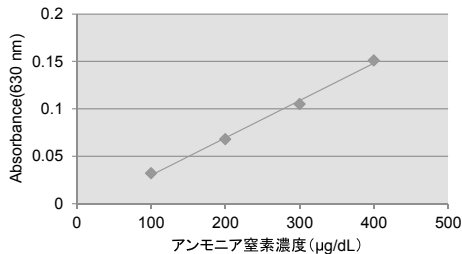
### (手法の場合)

- 試験管またはマイクロチューブ
- ピペット (試料採取用、試液分注用)
- 恒温槽 (37°C)
- 分光光度計及び 630nmのフィルターを持つ比色計

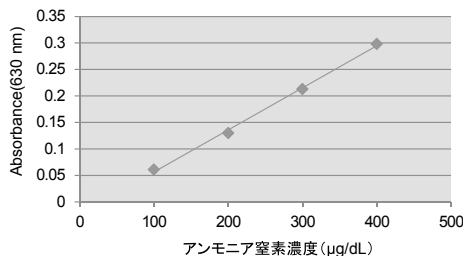


## 〔標準曲線〕

### (1) マイクロプレート法



### (2) 用手法



## 〔性能〕

### (1) 感度 (用手法)

- ・精製水を試料として操作した場合の吸光度は、0.010～0.070です。
- ・特定濃度の標準液 (アンモニア窒素400 µg/dL) を試料として操作した場合の吸光度は、0.200～0.370の範囲内です。

### (2) 特異性

- ・既知濃度の管理用血液を測定するとき、既知濃度の±35%以内にあります。

## 〔使用上の注意〕

### (1) 検体

- ・血中アンモニアは、採血後室温に放置すると経時的に上昇します。あらかじめ除タンパク試液を入れた試験管またはチューブに、採血後ただちに血液を入れ、すぐに混合し、遠心分離して下さい。
- ・上清は2～10℃または氷水中に保存し、1時間以内に測定して下さい。
- ・抗凝固剤のヘパリン、二重しゅう酸塩は使用しないで下さい。
- ・アミノ酸製剤は負誤差を与えますので注意して下さい。
- ・血中の各種アミノ酸は測定値に影響を与えることがあります。

### (2) 測定上の注意

- ・この説明書に記載された使用方法に従って使用して下さい。記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証しかねます。
- ・測定機器は取扱説明書に従い適切な条件下で使用して下さい。なお、詳細については機器メーカーに問い合わせして下さい。

- ・試薬は指定された条件で保管し、使用期限を過ぎたものは使用しないで下さい。
- ・誤って凍結させた試薬は使用しないで下さい。正しい結果が得られないことがあります。
- ・試薬の開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の条件で保存して下さい。
- ・本品中の容器、付属品は他の目的に転用しないで下さい。
- ・各試液は開栓したまま長時間放置しますと、アンモニアを吸収し、ばらつきの原因になります。密栓して2～10℃で保存して下さい。
- ・直射日光を避けて操作して下さい。
- ・指定された反応温度、反応時間以外での使用は避けて下さい。
- ・測定に使用する器具は弱アルカリ性で良く洗浄後水道水で洗浄し、ついでイオン交換水で良くすすいだものを使用して下さい。水道水中、蒸留水中には、アンモニアが不揮発性のアンモニウム塩の形でかなりの量が含まれています。器具の洗浄には特に注意して下さい。
- ・遠心分離後、上清を採取する時、上清中に浮遊物が混入しないように注意して下さい。浮遊物の混入は呈色がばらつく原因となります。
- ・操作は必ず正確な液量を用いて実施して下さい。液量が異なると、除タンパク上清成分、呈色液のpHなどが変動し、ばらつきの原因となります。
- ・本品は体外診断用には使用できません。

### (3) 危険防止に関する注意

- ・試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、直ちに大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当などを受けて下さい。
- ・除タンパク試液はpH 3以下の酸性溶液です。
- ・発色試液 B、発色試液 C は pH 11以上のアルカリ溶液です。
- ・ピペットをご使用の際は直接口で吸わないよう、必ず安全ピペッターなどを使用して下さい。

### (4) 廃棄に関する注意

- ・廃棄に際しては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律 (廃棄物処理法) および排水及び排水基準に従って適切に処理して下さい。
- ・発色試液 A 中にペンタシアノニトロシル鉄 (III) 酸ナトリウム二水和物を0.015%、フェノールを40g/L含有しています。
- ・検体と接触した場合試薬及び試薬容器などは、感染の危険性があるものとして処理して下さい。

使用期限：製造後18ヶ月

貯法：2～10℃・遮光保存

包装：700回用

製造発売元

**富士フイルム 和光純薬株式会社**

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741