

# 生化学分析および食品分析用テストコンビネーション

E-液状キット アンモニア  
ENZYTEC fluid Ammonia

製品番号  
E5390

包装単位  
10回×4本 測定用

食品およびその他の試料中のアンモニアの吸光度定量用試薬

## 方法

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) を用いた酵素 UV 試験法

## 測定原理

2-オキソグルタル酸 + NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NADH → グルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GLDH) → L-グルタミン酸 + NAD<sup>+</sup> + H<sub>2</sub>O

本測定キットに含まれる清澄化試薬により、ミルクの試料を 10 倍希釈 (1:10) することにより、直ぐに測定ができます (試料の調製法および測定法の項を参照下さい)。

## 保存条件および試薬の安定性

コンタミを避け、+4 °C で保存した場合、試薬類は表示の有効期限の月末まで安定です。凍結はしないで下さい。

## 警告および使用上の注意

- 試薬は保存剤としてアジ化ナトリウム (0.95 g/l) を含んでいます。飲み込まないようご注意ください。また皮膚や粘膜に触れないようご注意ください。
- 研究用試薬を使用する場合に必要な使用上の注意をお守り下さい。

## 試薬調製

試薬類および標準液はそのまま直ぐに使用できます。

## 追加 (添付はされておませんが測定に必要なもの)

蒸留水 (無菌状態で重金属を含有していない) および一般的な実験器具を使用します。

## 包装内容および試薬濃度

R1	4 × 20.0 ml	バッファー ADP GLDH 清澄化用試薬	pH 7.8 0.75 mmol/l ≥30 KU/l
R2	4 × 5.0 ml	NADH	≥1.3 mmol/l
R3	4 × 5.0 ml	バッファー 2-オキソグルタル酸	pH 8.0 60 mmol/l

## 測定操作

波長: 340 nm、Hg 334 nm、Hg 365 nm

光路長: 1.00 cm

温度: 室温 (+20°C ~) / +37 °C

測定対照: 水

以下の手順に従って手動で測定する場合、試薬ブランクは試験のたびに測定し、結果の計算には試料の測定値から差し引いてください。試料ブランクは試料それ自身に測定への影響が考えられる時のみ設定してください。

	試薬ブランク (RB)	試料	試料ブランク (SB) (SB は必要に応じ使用)
試料/コントロール	—	100 μl	100 μl
蒸留水	100 μl	—	—
R1	2000 μl	2000 μl	2000 μl
R2	500 μl	500 μl	500 μl
混和し、+37 °C 5 分、あるいは室温 (+20 °C ~) 15 分経過後、吸光度(A <sub>1</sub> )を測定します 次いで R3 を添加します			
R3	500 μl	500 μl	—
蒸留水	—	—	500 μl
混和し、反応終了まで待って (37 °C 5 分、あるいは室温 (+20 °C ~) 約 15 分経過後) 吸光度 (A <sub>2</sub> ) を測定します			

## 注)

R1 と R2 は予め混合し 1 種類の試薬のようにして使用します。R1 を 4 部、R2 を 1 部 (例 R1 20ml + R2 5ml) 混合し、混合液 2500 μl を測定に使用します。混合液は+4 °C で 1 週間安定ですが、光を遮蔽しておく必要があります。

## 計算

RB を使用して測定した場合:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{試料}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

SB を使用して測定した場合:

$$\Delta A = (A_2 - df \times A_1)_{\text{試料}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{SB}} - (A_2 - df \times A_1)_{\text{RB}}$$

df; 吸光度測定用に行った希釈、および反応液量を考慮した係数で、  
df = (試料液量 + R1 + R2) / (試料液量 + R1 + R2 + R3) = 0.839 となります。

従って計算式は以下のようになります。

$$C_{\text{アンモニア}} [\text{g/l 試料溶液}] = V \times MW \times \Delta A / \epsilon \times d \times v \times 1000$$

$$V(\text{終量})(\text{反応液量}) = 3100 [\mu\text{l}]$$

$$MW(\text{分子量}) = 17.03 [\text{g/mol}]$$

$$d(\text{光路長}) = 1.00 [\text{cm}]$$

$$v(\text{試料液量}) = 100 [\mu\text{l}]$$

$$\epsilon(\text{NADH の吸光係数}) [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \times \text{cm}^{-1}]: 340\text{nm} = 6.3, 334\text{nm} = 6.18, 365 \text{ nm} = 3.4$$

よって、定量結果は以下のように計算されます。

$$340\text{nm}: C_{\text{アンモニア}} [\text{g/l}] = 0.0838 \times \Delta A$$

$$334\text{nm}: = 0.0854 \times \Delta A$$

$$365\text{nm}: = 0.1553 \times \Delta A$$

上記の係数はパラメータを変更した場合 (例えば試料液量等)、再計算をし直してください。

試料の調製において、分析試料を希釈した場合は、これに希釈率を掛けてください。

固体試料についての計算は

$$C_{\text{アンモニア}} [\text{g}/100 \text{ g}] = (C_{\text{アンモニア}} [\text{g/l 試料溶液}] / \text{秤量}_{\text{試料}} [\text{g/l 試料溶液}]) \times 100$$

## キャリブレーション (校正) 用および測定用コントロール

自動吸光度測定システム用、ならびに精度および正確度管理用内部標準用として、新鮮なコントロールを調製する必要があります。硫酸アンモニウム 25 mg (分子量=132.1) を 100 ml 容量メスフラスコに正確に秤取りし、蒸留水を加えて溶解後、更に標線まで加えて液量を 100 ml に調節します。アンモニアの濃度として 64 mg/l となります (24 mg 秤取りした場合は、24 × 64/25 = 61.4 mg/l となります)。コントロールは常に新鮮なコントロールを使用します。

## 特長

- 測定範囲: 本法は 10 ~ 70 mg/l の範囲内のアンモニア (340 nm で測定) を測定することができます。測定範囲の上限を超えた場合は、試料を希釈して再測定してください。計算の際には希釈係数をかけます。
- 特異性: 本法はアンモニアに特異的な方法です。妨害因子は知られておりません。
- 検出限界: 340 nm 測定で、0.3 mg/l がアンモニアの最小検出濃度です。検出限界は、アンモニアを含まない試料を 20 回測定し、その標準偏差値を 3 倍した数値に相当します。