



品番 ROIK02

ビタミンC定量キット

(DNPH 法)

ビタミンC (L-アスコルビン酸) は強い還元作用をもつ水溶性ビタミンであり、コラーゲン合成など体内で進行する水酸化反応に重要な役割を果たします。ビタミンCには、還元型のアスコルビン酸(AsA)と酸化型のデヒドロアスコルビン酸(DHAsA)があり、本キットではAsA、DHAsAを合わせた、総ビタミンCの定量が行えます。

本キットの測定法は、1973年にDaniel W.B.らが論文で発表した比色定量法をもとに改良を加えたものです。

【キットの構成】 [100回測定分]*

1. 試薬①: 酸化剤 2 ml 1本
2. 試薬②: 5%メタリン酸/2%SnCl₂ 10 ml 1本
3. 試薬③: DNPH 1本 (44%(w/w)硫酸で溶解)
4. 試薬④: 5%メタリン酸 10 ml 1本
5. ビタミンC (L-アスコルビン酸) 標準原液 1 ml 1本

【試薬調製法】

試薬③の調製には硫酸を使用します。他に85%(w/w)硫酸も必要です。硫酸はキットに含まれていませんので、使用者で用意して下さい。取り扱いには十分ご注意ください。

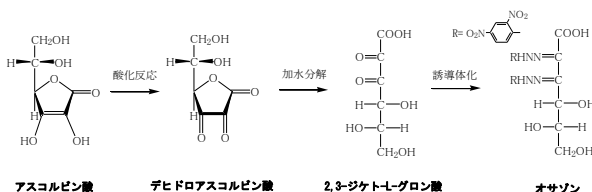
・試薬③: DNPHを3mlの44%(w/w)硫酸で溶解して使用(試薬③は完全に溶解しません。完全に溶解しなくても懸濁のまま使用して下さい。沈殿は測定に影響ありません。)

※ 本キットは1度に100回測定分(50検体分)測定を行う仕様になっています。

※ 調製した試薬は調製当日中にご使用ください。

- ・85%(w/w)硫酸の調整法
 - 95%硫酸 1.57 ml
 - 精製水 0.33 ml
- ・44%(w/w)硫酸の調整法
 - 95%硫酸 1.08 ml
 - 精製水 2.30 ml
- ・5.4%(w/v)メタリン酸の調整法
 - メタリン酸(塊状) 5.4gを精製水に溶かし、全量を100mlに調整する。

【測定原理】



酸化剤を用いてAsAを全てDHAsAに変換します。次に530nm付近に特異的な吸収を持つDNPH誘導体化し、AsAとDHAsAを合わせた総ビタミンCとして定量を行います。

【使用目的】

臓器・組織中及び血漿中ビタミンC (L-アスコルビン酸) の測定

【操作法】

1. 必要な器具・器材
 - ・マイクロピペッター
 - ・恒温槽 (37°C)
 - ・プレートリーダー (530 nm) または、分光光度計 ※100 μl キュベット使用

2. 検体調製法(例) ※全ての操作を氷上で行って下さい。また、検体調製操作に必要なメタリン酸は本キットには含まれていません。

「臓器・組織」

- ① 組織重量の14倍量の5.4%(w/v)メタリン酸を加え(最終濃度: 5%(w/v))、ホモジナイズする。
- ② 遠心 (10,000 g, 15分, 4°C)
- ③ 上清を別のチューブに移し、直ぐに使用しない場合は-20°Cで保存する。

「血漿」

- ① 血漿に等量の10%(w/v)メタリン酸を加え(最終濃度: 5%(w/v))、攪拌する。
- ② 遠心 (10,000 g, 15分, 4°C)
- ③ 上清を別のチューブに移し、直ぐに使用しない場合は-20°Cで保存する。

【測定操作法】

	検体・検体盲検 (S) (SBI)	標準 (Std)
試料	試料 200 μl	標準液 200 μl
試薬①	12 μl	12 μl
室温にて3-5分放置		
試薬②※1	70 μl	70 μl

ここまでの全容量は、282 μl になります。

↓ 別のチューブに分注 ↓

	A液	B液
	検体 (S)	検体盲検 (SBI)
	A液 80 μl を分注	A液 80 μl を分注
試薬③	20 μl	20 μl
37°Cで3時間放置※2		
85%硫酸※3	100 μl	100 μl
試薬④	20 μl	20 μl

室温にて30分放置

各100 μlを96 well plateに移し
プレートリーダーにて波長530 nmの吸光度を測定

分光光度計 (530 nm) でも測定できます。

※100 μl キュベット使用

各検体の実質吸光度は、検体(S)の吸光度から検体盲検(SBI)の吸光度を引いた値になります。

標準(Std)の吸光度は補正の必要はありません。

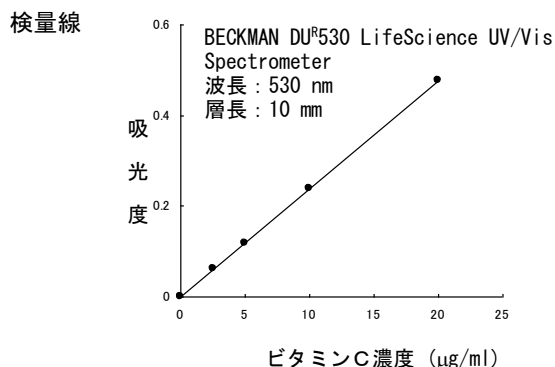
- ※1 試薬②は使用直前によく振って使用して下さい。沈殿物は完全に溶解しません。懸濁のまま使用して下さい。沈殿は測定に影響ありません。試薬②を加えたら、紫色が十分に消えるまで放置して下さい。
- ※2 赤色の沈殿が析出します。
- ※3 前操作で生成した沈殿をよく溶かして下さい。

【検量線作成法】

表に従ってビタミンC標準原液を試薬④で希釈して下さい。これを標準(Std)として、測定操作法に従い操作して下さい。

No.	ビタミンC標準原液	試薬④ 5%メタリン酸	濃度
1	----	400 μ l	0
2	5 μ l	395 μ l	2.5 μ g/ml
3	10 μ l	390 μ l	5 μ g/ml
4	20 μ l	380 μ l	10 μ g/ml
5	40 μ l	360 μ l	20 μ g/ml

濃度を横軸に、吸光度を縦軸にとりますと図のような検量線が描かれます。



- ※ プレートリーダーにて測定した場合、プレートリーダーの会社や機種、およびマルチプレートの材質や透明度により、通常は吸光度計を用いた値よりも測定値が小さくなります。測定自体には、問題ありません。

製造元

株式会社シマ研究所

〒174-0063

東京都板橋区前野町3-6-106

販売元 (問合せ先)

コスモ・バイオ株式会社

〒135-001

東京都江東区東陽2-2-20 東陽駅前ビル8F

TEL : 03-5632-9610 FAX : 03-5632-9619

Mail : service@cosmobio.co.jp