

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Р.А. Часнойть

30 января 2009 г.

Регистрационный № 193-1208

**МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ  $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА  
И РЕТИНОЛА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУО «Белорусская медицинская академия  
последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. И.В. Тарасюк, Т.М. Юрага, С.И. Станкевич,  
канд. мед. наук, доц. О.Н. Почепень, О.М. Чередник

Минск 2009

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Встряхиватель «VORTEX Genius 3», 2000 колебаний/мин, «ИКА» (Германия).
2. Спектрофлуориметр «Hitachi» (Япония).
3. Центрифуга ОПН-3 (РФ).
4. Стеклянные пробирки с притертыми пробками.
5. Пипетки полуавтоматические одноканальные со сменными наконечниками, переменным объемом 200–1000 мкл, 1–5 мл.
6. Этиловый спирт 96%.
7. Гексан.
8. Вода бидистиллированная.
9. Стандарты:
  - α-токоферолацетат;
  - ретинолацетат.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Указанная методика может широко применяться в медицине (в кардиологии, онкологии, урологии, эндокринологии, гастроэнтерологии, педиатрии, гинекологии, дерматовенерологии, неврологии, психиатрии, пульмонологии и др.). Метод позволяет осуществлять лабораторную диагностику при лечении различных заболеваний (атеросклероз, инфаркт миокарда, ишемические поражения органов, сахарный диабет, острый панкреатит, обширные ожоги, травмы, расстройства иммунной системы и др.).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Не выявлены.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА**

#### **Подготовка исследуемого материала**

1. В пробирки вносят по 200 мкл сыворотки крови.
2. В стандартные пробы вносят 200 мкл рабочего стандартного раствора α-токоферолацетата для определения витамина Е и ретинолацетата — для определения витамина А.

#### **Ход исследования**

1. Добавить к исследуемому образцу 1 мл бидистиллированной воды.
2. Встряхивать пробы в течение 30 с.
3. Добавить в каждую пробу 1 мл этилового спирта.
4. Встряхивать пробы в течение 30 с.
5. Добавить к образцу 5 мл гексана.
6. Энергично встряхивать не менее 20 мин.
7. Инкубировать в темноте 15 мин или центрифугировать 10 мин при 1500 об/мин.

## **Идентификация результатов**

1. Провести измерение флюоресценции на спектрофлюориметре, настроенном на волну возбуждения 295 нм и волну испускания 320 нм для  $\alpha$ -токоферола, а для ретинола соответственно 335 и 460 нм.
2. Ширину щели установить 8/8.
3. Концентрацию витаминов определить по формуле:

$$C_{\text{обр}} = (\Phi_{\text{об}} - \Phi_{\text{к}}) / \Phi_{\text{ст}} * C_{\text{ст}},$$

где  $\Phi_{\text{обр}}$ ,  $\Phi_{\text{к}}$  и  $\Phi_{\text{ст}}$  — интенсивность флюоресценции образца сыворотки, контрольного образца и стандарта;

$C_{\text{ст}}$  — концентрация вещества в рабочем стандартном растворе.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ И ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА МЕТОДА. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ**

1. Нарушение технологии выполнения анализа.
2. Использование реагентов с истекшим сроком годности.
3. Неточное пипетирование реагентов.
4. Неправильный забор и хранение образцов биоматериала.

### **Пути устранения**

1. Соблюдение последовательности операций и аккуратное выполнение анализа является обязательным. Наличие в лаборатории пула контрольных сывороток создает уверенность в надежности получаемого результата.
2. Использование реагентов с истекшим сроком годности запрещено.
3. Все необходимые растворы для проведения анализа должны готовиться непосредственно перед работой.
4. На всех этапах проведения исследования должен работать один и тот же сотрудник. Все пробы исследовать в дублях.

Если дозируемый объем раствора минимальный из допустимого диапазона, то при работе используется легко вспенивающаяся жидкость или раствор с большой вязкостью; необходимо применять обратный способ пипетирования.

4. Применение пластиковых пробирок при взятии образцов биоматериала позволяет избежать контактной активации протеолитических систем.

Исследуемые образцы сыворотки (плазмы) могут храниться при температуре 2–8 °С в течение 24 ч. При плановых исследованиях возможно накопление проб и хранение в замороженном виде при температуре -20 °С до использования.

Контроль качества лабораторных исследований осуществляется методами оценки параллельных, повторных и смешанных проб.

Все пробы исследуют в дублях, поэтому интенсивность флюоресценции образца и стандарта рассчитывают по средним значениям

флюоресценций параллельных проб. Разница между пробами при измерении концентрации витамина Е не должна превышать 15,4% для сыворотки и 4,1% для стандартов, при измерении концентрации витамина А — соответственно 13,3 и 5,6%. Эти значения получены при расчете  $X \pm s_x$  из 50 параллельных проб сыворотки и стандартных растворов. Если разница превышает указанные границы, данные нельзя считать достоверными, и пробы должны исследоваться повторно.

Необходимое качество и стандартизация определения не достигаются использованием лишь стандартных растворов, так как они менее чувствительны к разным методическим отклонениям, нежели сыворотка. Поэтому одновременно со стандартами необходимо исследовать контрольные сыворотки, которые можно изготовить путем сбора остатков образцов сывороток в один пул с последующей обработкой и расфасовкой в нужных количествах.

Возможность хранения образцов сыворотки в замороженном виде не более 3 месяцев позволяет использовать такие слитые сыворотки одного приготовления в течение продолжительного времени.

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам Министерства здравоохранения Республики Беларусь, инструкциям по охране труда для КДЛ и инструкциям по эксплуатации разработанных и утвержденных медицинских измерительных приборов.

#### Хронометраж метода

№ пп	Содержание работ	Время, мин	
		единичное	каждое последующее
1	Подготовка реактивов к проведению анализа	5	1
2	Внесение контрольных, исследуемых образцов в пробирки	1	0,5
3	Внесение бидистиллированной воды	1	0,5
4	Встряхивание ручное	0,5	0,5
5	Внесение этилового спирта	1	0,5
6	Встряхивание ручное	0,5	0,5
7	Внесение гексана	1	0,5
8	Встряхивание на вибровстряхивателе	20	20
9	Инкубация	15	15
10	Измерение образцов	8	2
11	Расчет концентрации	2	2
Всего		55	43