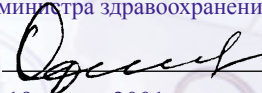


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель
министра здравоохранения



В.И. Ореховский

19 марта 2001 г.

Регистрационный № 91-0008

**Фотометрический метод определения нитратов
и нитритов в биологических жидкостях
(инструкция по применению)**

Учреждение-разработчик: Витебский государственный медицинский университет

Авторы: д-р мед. наук А.П. Солодков, И.С. Веремей, канд. мед. наук С.С. Осочук, И.Ю. Щербинин,
Г.В. Деюн, А.В. Дубровская

[Перейти к оглавлению](#)

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|---|
| Показания к применению | 3 |
| Перечень необходимого медицинского оборудования, реактивов, инструментария..... | 4 |
| Описание технологии использования метода..... | 5 |
| 1. Определение уровня нитратов и нитритов в плазме крови..... | 5 |
| 2. Определение уровня нитратов и нитритов в моче | 7 |
| Возможные осложнения и ошибки | 8 |
| Противопоказания к применению | 9 |

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Определение оксида азота (NO) в биологических жидкостях представляет значительный научно-практический интерес в связи с участием NO во многих физиологических процессах организма в качестве эндотелиального релаксирующего фактора. Прямые методы измерения молярной концентрации NO очень сложны и требуют дорогостоящего оборудования, в то время как количественная оценка продуктов превращения NO (нитратов и нитритов) доступна и может быть использована в клинической практике. В настоящее время происходит интенсивное накопление фактического материала по содержанию продуктов метаболизма NO ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) при различных патологических состояниях, связанных с нарушением гемодинамики. Уровень конечных продуктов метаболизма ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) в моче и плазме больных инфарктом миокарда (ИМ) в 1-й день заболевания можно использовать в качестве дополнительного прогностического критерия течения и прогноза ИМ: при концентрации нитратов и нитритов от 20,0 мкмоль/л в моче и от 5,0 мкмоль/л в плазме в 1-е сутки заболевания отмечается неблагоприятный прогноз и тяжелое клиническое течение ИМ; при уровне конечных продуктов деградации NO от 20,0 до 90,0 мкмоль/л в моче и от 5,0 до 30,0 мкмоль/л в плазме в 1-е сутки заболевания отмечается неосложненное течение ИМ (Драпкина О.М. и др., 2000). Доказана связь между динамическими изменениями уровня нитратов и нитритов и тяжести течения геморрагического инсульта (Карпюк В.Б., 1999). NO является главным медиатором инфекционно-токсического шока (Vasilev D. et al., 1999). Было доказано, что если во время церебральной малярии у детей наблюдается высокий уровень нитратов, то это сопровождается, как правило, более тяжелой и продолжительной комой (Al Yaman F.M. et al., 1996). Таким образом, содержание продуктов деградации NO в моче и плазме может рассматриваться как прогностический критерий тяжести процесса, исхода заболевания и эффективности лечения.

В Центральной научно-исследовательской лаборатории ВГМУ разработан метод количественного определения нитратов и нитритов в плазме и моче с использованием в качестве восстановителя нитратов в нитриты однократной навески цинковой пыли, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, с последующим фотометрическим определением нитрит-ионов с помощью реакции Грисса.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ

- Спектрофотометр СФ-46;
- весы аналитические;
- весы лабораторные электронные;
- магнитный смеситель с магнитом цилиндрическим;
- центрифуга лабораторная ОПн-8;
- иономер И-160;
- колбы стеклянные мерные;
- пробирки пластиковые с крышечкой;
- пробирки конические центрифужные;
- сульфаниловая кислота;
- 1-нафтиламин солянокислый ч.д.а.;
- натрия нитрит ч.д.а.;
- калия нитрат ч.д.а.;
- цинковая пыль ч.д.а.;
- ацетат натрия х.ч.;
- хлорид аммония х.ч.;
- раствор аммиака 25% ч.д.а.;
- цинка сульфат ч.д.а.;
- натрия гидроксид ч.д.а.;
- меди сульфат ч.д.а.;

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

1. Определение уровня нитратов и нитритов в плазме крови

1.1. Приготовление исходных растворов реагентов

1.1.1. Сульфаниловая кислота. Растворить 0,6 г реактива в 70 мл воды, прибавить 20 мл концентрированной хлористо-водородной (или уксусной) кислоты и разбавить до 100 мл.

1.1.2. 1-нафтиламин солянокислый. Растворить 0,6 г солянокислого нафтиламина в воде, добавив 1 мл концентрированной хлористо-водородной кислоты, разбавить до 100 мл и хранить в холодильнике (срок хранения 1 мес.).

1.1.3. Ацетат натрия. Навеску 16,4 г безводной соли растворить в 50 мл дистиллированной воды и фильтровать в мерную колбу на 100 мл. Довести объем до метки, промывая фильтр.

1.1.4. Стандартный раствор нитрита. Точную навеску нитрита натрия (0,0345 г) растворить в мерной колбе (500 мл) в дистиллированной воде (концентрация нитрита 1000 мкмоль/л).

1.1.5. Стандартный раствор нитрата. Количественно перенести 0,0505 г нитрата калия в мерную колбу на 500 мл и довести водой до метки ($C = 1000$ мкмоль/л).

1.1.6. Раствор сульфата меди. Поместить в мерную колбу 0,8 г сульфата меди, добавить 2 мл 25% раствора аммиака; 3 мл аммиачного буфера pH 9,6 довести дистиллированной водой до 50 мл.

1.1.7. Ампулу 0,1 N фиксонала NaOH количественно перенести в мерную колбу на 100 мл и довести дистиллированной водой до метки (1 N раствор NaOH).

1.1.8. Аммиачный буфер (pH = 9,6). Поместить 7 мл 25% раствора аммиака в мерную колбу на 500 мл и довести водой до метки. Растворить 2,675 г хлорида аммония в мерной колбе на 500 мл и довести водой до метки. В мерный цилиндр поместить 30,6 мл раствора хлорида аммония и довести до 100 мл раствором аммиака. Довести на иономере приготовленными растворами значение pH до 9,6.

1.1.9. Раствор цинка сульфата 6%. Растворить 6 г порошка цинка сульфата в мерной колбе на 100 мл и довести водой до метки.

1.2. Построение калибровочного графика для определения нитратов

1.2.1. Пронумеровать пять мерных колб на 100 мл, добавить туда 2, 4, 6, 8, 10 мл стандартного раствора нитрата калия $C = 1000$ мкмоль/л и довести водой до метки. Концентрация нитратов в каждой колбе равна 20, 40, 60, 80, 100 мкмоль/л соответственно. В 15 пластиковых пробирок, пронумерованных 1, 1¹, 1¹¹, 2, 2¹, 2¹¹ и т. д. (для трехкратного повторения), добавить 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди и по 1 мл пробы из каждой мерной колбы: из колбы № 1 в пробирки 1, 1¹, 1¹¹; из колбы № 2 в пробирки 2, 2¹, 2¹¹ и т. д. Пробирки укупорить и встряхивать в течение 20 мин. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 об./мин (1500 g) в течение 10 мин.

1.2.2. Пронумеровать 15 стеклянных пробирок так же, как и пластиковые. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по маркировке стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставить в холодильник на 10 мин до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин при длине волны 520 нм.

1.2.3. Построить калибровочный график (см. рис.).

1.2.4. При наличии компьютера калибровочный график построить с использованием регрессионного анализа.

1.2.5. Нижний надежный предел обнаружения нитратов данным методом составил 5,46 мкмоль/л.

1.3. Проведение основного опыта

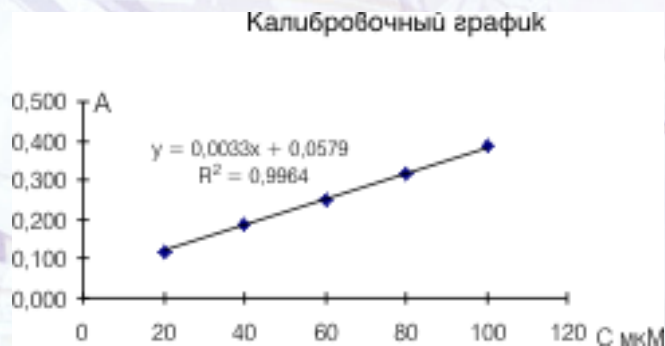
1.3.1. Депротеинизация: к 1 мл плазмы добавить 1 мл 6% раствора цинка сульфата. Оставить на 1 ч при температуре ниже 15° С. Центрифугировать при 6000 об./мин (3000 g).

1.3.2. Определение: к 1 мл супернатанта добавить эквивалентное количество гидроксида натрия (300 мкл 1 N раствора), центрифугировать и 1 мл надосадочной жидкости перенести в соответствующую по нумерации пластиковую пробирку с предварительно добавленными туда 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки укупорить и встряхивать в течение 30 мин. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 об./мин (1500 g) в течение 10 мин.

Фотометрический метод определения нитратов и нитритов в биологических жидкостях

1.3.3. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по нумерации стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставить в холодильнике на 10 мин до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин при длине волны 520 нм.

1.3.4. Расчет: концентрацию нитратов рассчитать по уравнению калибровочного графика с учетом разведения при депротеинизации. Например, уравнение регрессии калибровочного графика $y = 0,0033x + 0,0579$, где y — оптическая плотность, тогда x (концентрация) = $(y - 0,0579) / 0,0033$, следовательно, концентрация нитратов и нитритов в пробе с учетом разбавления при депротеинизации — $C = (y - 0,0579) / 0,0033 \times k$, где k — коэффициент разбавления при депротеинизации.



Зависимость оптической плотности от концентрации NO_3^-

2. Определение уровня нитратов и нитритов в моче

2.1. **Пробоподготовка.** К 1 мл мочи прибавить 0,25 г активированного угля и 3 мл дистиллированной воды, перемешать и угольную пыль осадить центрифугированием (5000 об./мин).

2.2. **Определение.** Перенести 1 мл надосадочной жидкости в соответствующую по нумерации пластиковую пробирку с предварительно добавленными туда 0,11 г цинковой пыли, 0,5 мл аммиачного буфера, 20 мкл аммиачного комплекса сульфата меди. Пробирки укупорить и встряхивать в течение 30 мин. Цинковую пыль осадить центрифугированием при 3000 об./мин в течение 10 мин. Из каждой пластиковой пробирки перенести по 1 мл супернатанта в соответствующую по нумерации стеклянную пробирку. В каждую пробирку добавить по 1 мл сульфаниловой кислоты и оставить в холодильнике на 10 мин до завершения реакции диазотирования. Затем в каждую пробирку внести по 1 мл раствора ацетата натрия и 1 мл раствора 1-нафтиламина солянокислого. Измерить оптическую плотность спустя 30 мин при длине волны 520 нм.

2.3. **Расчет.** Концентрацию нитратов рассчитать по уравнению калибровочного графика с учетом разведения при пробоподготовке. Например, уравнение регрессии калибровочного графика $y = ax + b$, где y — оптическая плотность, a и b — коэффициенты уравнения линейной регрессии, тогда x (концентрация) = $(y-b)/a$, следовательно, концентрация нитратов и нитритов в пробе с учетом разбавления при пробоподготовке — $C = k((y-b)/a)$, где k — коэффициент разбавления при пробоподготовке.

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

1. При определении уровня нитратов и нитритов в плазме необходимо использовать в качестве коагулянта гепарин, поскольку введение хелаторов (цитрат, ЭДТА) в систему значительно снижает воспроизводимость метода.
2. При смене цинковой пыли необходимо построить новый калибровочный график.
3. Следует отметить, что зависимость между концентрацией нитратов и оптической плотностью линейная, а следовательно и предел обнаружения в значительной степени зависит от чистоты реактивов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

1. Метод не может быть использован при депротеинизации трихлоруксусной кислотой, спиртом, ацетонитрилом, вольфрамовой кислотой, поскольку эти реагенты в значительной степени влияют на условия конверсии нитратов в нитриты. Депротеинизацию плазмы следует проводить с использованием 6% раствора сульфата цинка.

2. При концентрации нитратов и нитритов ниже 5,46 мкмоль/л требуются особо чистые реактивы, в противном случае будет нарушаться надежность определения.