



УТВЕРЖДАЮ

Зам. начальника Медико-тех-
нического управления МЗ РФ
О.Б. Архангельский
"20" 11 1992 г.

ИНСТРУКЦИЯ *

по применению набора реактивов для определения
общего холестерина ферментативным методом
(Новохол)

Рекомендована к утверждению
экспертной комиссией по лабо-
раторным реактивам Комитета по
новой медицинской технике МЗ РФ
(протокол № 5 от "26" 10 1992 г.)

НАЗНАЧЕНИЕ

Набор предназначен для количественного определения холесте-
рина (ХС) в сыворотке крови в клинико-диагностических и биохимиче-
ских лабораториях и научно-исследовательской практике.

Набор рассчитан на проведение 100 определений при расходе
рабочего реагента 1 мл на одно определение и пригоден для
различных вариантов микроанализа.

Хранение набора - в тёмном месте при температуре (2-8) °С.

* Инструкция составлена В.И.Пупковой, В.А.Старостиной, к.х.н.,
зав.лабораториями - сотрудниками НИПО "Биостарт", и М.Б. Кудряв-
цевой - зав. КДЛ Областной клинической больницы г.Новосибирска.

Синицина
27.10.92

ПРИНЦИП МЕТОДА

Принцип определения общего холестерина в сыворотке крови с помощью предлагаемого набора основан на использовании сопряженных ферментативных реакций, катализируемых: а) холестеролэстеразой, катализирующей гидролиз эфиров холестерина до свободного холестерина; б) холестеролоксидазой, катализирующей превращение холестерина в холестерон с образованием перекиси водорода; в) пероксидазой, катализирующей окисление перекисью водорода 4-аминоантипирина (4-ААП) и фенола с образованием окрашенного продукта розово-малинового цвета с максимумом поглощения при 500 нм. Интенсивность окраски образовавшегося продукта пропорциональна концентрации холестерина.

РЕАКТИВЫ

1. Реагент 1 - фосфатный буферный раствор с фенолом.
 2. Реагент 2 - смесь лиофильно высушенных ферментов холестеролэстеразы, холестеролоксидазы и пероксидазы, 4-ААП и стабилизатора.
 3. Калибратор - калибровочный раствор холестерина 4,65 ммоль/л, готовый для использования.
 4. Контрольная сыворотка с известным содержанием холестерина.
- Конечные концентрации Реагента 1 и Реагента 2 в объеме пробы 1 мл:

- фосфатный буфер - 0,1 ммоль;
- холестеролэстераза - 0,20 ед.;
- холестеролоксидаза - 0,10 ед.;
- пероксидаза - 0,08 ед.;
- фенол - 0,564 мг;
- 4-ААП - 0,103 мг

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАБОЧЕГО РЕАГЕНТА

Содержимое флакона Реагента 2 растворяют в 20 мл воды дистиллированной и прокипяченной и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл. Туда же количественно переносят содержимое флакона Реагента 1. Объем колбы доводят до метки дистиллированной и прокипяченной водой, перемешивают и переносят раствор в склянку из темного стекла.

Рабочий реагент хранят при температуре (2-8) °С. Раствор годен в течение 1 месяца.

Оптическая плотность рабочего реагента при 500 нм должна быть не более 0,10.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРА КОНТРОЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ

Содержимое флакона с контрольной сывороткой растворяют в 1 мл дистиллированной и прокипяченной воды.

Раствор сыворотки хранят при температуре (2-8) °С. Раствор годен в течение 7 суток.

ОБОРУДОВАНИЕ

Спектрофотометр, регистрирующий оптическую плотность в видимой области спектра, фотоэлектроколориметр, биохимические полу- и автоматические анализаторы, термостат, поддерживающий температуру 37 °С.

МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

При работе с наборами следует одевать одноразовые резиновые перчатки, т.к. данный набор содержит производные человеческой крови, которые следует рассматривать, как потенциально инфекционные, в связи с тем, что до настоящего времени ни один метод обработки крови не дает гарантии того, что используемые производные крови человека не способны передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

Производные человеческой крови, используемые в данном наборе, были исследованы на вышеуказанные возбудители, результаты анализов были отрицательными, но тем не менее следует соблюдать вышеуказанные предосторожности.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

I. Определение концентрации холестерина на спектрофотометре и фотоэлектроколориметре.

Компоненты реакционной смеси для определения концентрации холестерина в сыворотке крови отбирают в количествах, указанных в табл. I.

Таблица I

Компоненты реакционной смеси	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Холостая проба, мл
Сыворотка крови	0,03 (0,01)	-	-
Дистиллированная вода	-	-	0,03 (0,01)
Калибратор	-	0,03 (0,01)	-
Рабочий реагент	3,00 (1,00)	3,00 (1,00)	3,00 (1,00)

В скобках указаны объемы реагентов при проведении микроанализа в объеме реакционной смеси I мл.

Реакционную смесь перемешивают и выдерживают в течение 20 минут при температуре 37 °С. Измеряют оптическую плотность растворов опытной и калибровочной проб против холостой пробы при длине волны 500 нм. Окраска раствора стабильна в течение I ч.

РАСЧЕТ КОНЦЕНТРАЦИИ ХОЛЕСТЕРИНА

1. Содержание холестерина в сыворотке крови (х) в ммоль/л определяют по формуле

$$x = A_1/A_2 \cdot 4,65$$

где A_1 - оптическая плотность раствора исследуемой пробы;

A_2 - оптическая плотность раствора калибровочной пробы;

4,65 - концентрация холестерина в калибраторе, ммоль/л.

2. Определение концентрации холестерина на биохимическом автоматическом анализаторе.

В качестве примера описано определение концентрации холестерина на анализаторе *Coulter* С.Р.А., Франция.

Измерения проводят по заданной программе в автоматическом режиме. Объемы компонентов приведены в табл.2.

Таблица 2

Компоненты реакционной смеси	Опытная проба, мл	Калибровочная проба, мл	Холостая проба, мл
Дистиллированная вода	-	-	0,005
Калибратор	-	0,005	-
Исследуемая проба (сыворотка крови)	0,005	-	-
Рабочий реагент	0,290	0,290	0,290

Расчет концентрации холестерина проводится микропроцессором.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРА

Специфичность набора обусловлена использованием холестерол-эстеразы, гидролизующей эфиры ХС, холестеролоксидазы и пероксидазы, окисляющих холестерин и субстраты пероксидазы.

Линейная область определения концентрации холестерина-до 20 ммоль/л, отклонение от линейности не превышает 6 %.

Качество набора контролируют по контрольной сыворотке с известной концентрацией холестерина, входящей в состав набора. Воспроизводимость результатов не менее 94 %, правильность определения 100 ± 6 %.

Нормальные величины концентрации холестерина в сыворотке крови для различных возрастов составляют:

- 20-29 лет - 3,70-6,51 ммоль/л
- 30-39 лет - 4,25-7,04 ммоль/л
- 40-49 лет - 4,37-7,70 ммоль/л
- 50 и более - 4,55-8,24 ммоль/л

Рекомендуется в каждой лаборатории уточнить диапазон значений нормальных величин.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться по адресу: 630091, Новосибирск, ул.Гоголя, 14, МНПО "Биостарт"; тел.74-31-41; 35-75-23.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G. et al., Clin Chem., 1974, 20, N 4, 470-475*
2. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник.-М: Медицина, 1987.

Зав.лабораторией МНПО "Биостарт", к.х.н. *Пупкова* В.И.Пупкова

Зав.лабораторией МНПО "Биостарт", к.х.н. *Старостина* В.К.Старостина

Зав.КДЛ Областной клинической больницы г.Новосибирска *Кудрявцева* М.Б.Кудрявцева

Прошнуровано, пронумеровано и
скреплено печатью 5 листов

Подпись

