МИНИСТЕРСТВО
СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР

Главное управление ветеринарии

ВСЕСОЮЗНАЯ АКАДЕМИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
ИМЕНИ В. И. ЛЕНИНА

Отделение ветеринарии

Методические указания по применению унифицированных биохимических методов исследований крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях

Москва—1981

gost.e-ecolog.ru

Министерство сельского хозяйства СССР

Главное управление ветеринарии

Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук
имени В.И.Ленина

Отделение ветеринарии

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ УНИФИЦИРОВАННЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЙ КРОВИ, МОЧИ И МОЛОКА В ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

Утверждаю:
Академик-секретарь
Отделения ветеринарии
ВАСХНИЛ
академик

В.П.Шишков

29 июня 1981 г.

Москва - 1981

Методические указания подготовлены Всесоюзным научно-исследовательским институтом незаразных болезней животных (В.Т.Самохин, П.Е.Петров), Отделением ветеринарии ВАСХНИЛ (И.М Беляков), Московской ветеринарной академией (И.П.Кондрахин), Рязанским сельскохозяйственным институтом (П.Т.Лебедев), Всесоюзным научно-исследовательским институтом физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных (В.П.Радченков) и Центральной ветеринарной лабораторией МСХ СССР (В.Я.Антонов).

Методические указания одобрены секцией "Патология, терапия и профилактика незаразных болезней животных" Отделения ветеринарии ВАСХНИЛ 20 октября 1977 г., Научно-техническим советом МСХ СССР 28 июня 1979 г., утверждены Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 3 апреля 1981 г.

Ответственный за выпуск - доцент И.М.Беляков (Отделение ветеринарии ВАСХНИЛ).

Методические указания предназначены для республиканских и областных ветеринарных лабораторий.

© Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук имени В.И.Ленина

I. ВВЕДЕНИЕ

I.I. В настоящих методических указаниях представлены унифицированные методы биохимических исследований крови, мочи и молока для использования в ветеринарных лабораториях.

I.2. Использование унифицированных методов обеспечивает стандартизацию проводимых исследований в ветеринарных лабораториях и получение сравнимых результатов.

I.3. Сроки проведения плановых исследований и количество анализируемых проб крови, мочи и молока по контролю за состоянием обмена веществ у животных на комплексах и в крупных специализированных хозяйствах регламентируют ветеринарные лаборатории.

I.4. Ветеринарные специалисты комплексов и специализированных хозяйств в соответствии с планом-графиком, утвержденным директором ветеринарной лаборатории, проводят клиническое обследование животных, подбирают группы и организуют отбор проб для биохимических исследований.

2. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ПРОБ КРОВИ

2.I. Пробирки для отбора проб крови ветеринарные специалисты хозяйств получают в ветеринарной лаборатории: на каждое животное по 2 биологических пробирки (№ I и № 2, объемом не менее 20 мл) и по 2 центрифужных (№ 3 и № 4, объемом II-I2 мл).

2.I.I. В пробирку № I для получения цельной крови и плазмы сотрудники ветеринарной лаборатории предварительно вносят по 2-3 капли I%-ного раствора гепарина на каждые I5-20 мл крови.

2.I.2. В случаях, когда содержание натрия в плазме крови не определяется, вместо гепарина можно использовать лимоннокислый или щавелевокислый натрий по I5-20 мг на каждые I5-20 мл крови.

2.I.3. Пробирка № 2 остается сухой для получения сыворотки.

2.I.4. В одну из центрифужных пробирок (№ 3) вносят 0,5 мл вазелинового масла и каплю I%-ного раствора гепарина, в другую (№ 4 – градуированную) - 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ)

2.I.5. Все пробирки закрываются резиновыми пробками. Пробирки 4 помещаются в термос со льдом.

2.2. Пробы крови берут у животных перед кормлением или через 5-6 часов после кормления.

2.3. Кровь набирают в пробирки № I № 2 и № 3 по стенке во избежании гемолиза.

2.3.I. Кровь в пробирках № I и № 3 осторожно перемешивают путем 3-кратного перевёртывания пробирок.

2.3.2. В градуированную пробирку № 4 с раствором ТХУ приливают из пробирки № I 5 мл крови (до отметки I0 мл) и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

2.3.3. Пробирки №№ I, 3 и 4 ставят в термос со льдом, пробирку № 2 транспортируют летом обычным путём, а зимой - предохраняют от замерзания.

2.4. В лаборатории кровь в пробирке № 2 обводят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром I,0-I,5 мм и ставят в термостат при температуре 37-38°С для окончательного отделения сыворотки.

2.4.I. Отделившуюся сыворотку сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20-30 мин при 2000-3000 об/мин.

2.4.2. В сыворотке крови определяют содержание общего белка, белковых фракций, мочевины, общих липидов, общего холестерина, общего кальция, йода неорганического, связанного с белками (СБИ) и активность щелочной фосфатазы.

2.5. Для получения плазмы кровь в пробирках с антикоагулянтом (№I) осторожно перемешивают, наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20-30 мин при 2000-3000 об/мин. Плазму переносят в другие пробирки и хранят в холодильнике.

2.5.I. В плазме крови определяют содержание натрия, калия, каротина, витаминов А и С.

2.6. В цельной крови из пробирки № I определяют гематокрит, кетоновые тела, медь, цинк, кобальт, марганец.

2.7. Кровь в пробирке № 3 с вазелиновым маслом центрифугируют 20-30 мин при 2000-3000 об/мин. В плазме определяют содержание CO_2 (щелочной резерв).

2.8. Смесь крови и ТХУ в пробирке № 4 центрифугируют в течение 20-30 мин при 2000-3000 об/мин. Верхний слой (безбелковый фильтрат) сливают в другую пробирку и в ней определяют глюкозу, неорганический фосфор и неорганический магний. Безбелковый фильтрат крови хранят в холодильнике не более 5 дней.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

3.I. Принцип метода

Содержание белка определяют по рефракции сыворотки крови.

3.2. Реактивы

3.2.I. Смесь этилового спирта с серным эфиром I:I.
3.2.2. Дистиллированная вода.

3.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

3.3.I. Спирт этиловый 96%-ный - 50 мл.
3.3.2. Эфир серный (для наркоза)- 50 мл.

3.4. Специальное оборудование и аппаратура

3.4.I. Рефрактометр типа RL (ПНР) РДУ, ИРФ - 454, УРЛ и др.
3.4.2. Холодильник бытовой, поддерживающий температуру 4-6°С.
3.4.3. Термометр на 50°С.
3.4.4. Термостат, поддерживающий температуру 38±I°С.
3.4.5. Стеклянная палочка.
3.4.6. Марлевые салфетки.
3.4.7. Вата.
3.4.8. Стаканчики.
3.4.9. Пробирки биологические.
3.4.I0. Пробирки центрифужные.
3.4.II. Центрифуга.

3.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови (пп.2.I., 2.2., 2.3., 2.4.).

3.6. Ход определения

3.6.I. Стеклянной палочкой на призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды и закрывают камеру.
3.6.2. Проводят подготовку прибора к работе: регулировочным винтом устанавливают шкалу рефрактометра на отметку I.3330.
3.6.3. Удаляют воду с призмы марлевой салфеткой и протирают ватой, смоченной смесью этилового спирта с серным эфиром.
3.6.4. Наносят каплю сыворотки крови на призму стеклянной палочкой, закрывают камеру и 2 раза производят отсчёт. Вычисляют среднее показание.
3.6.5. Марлевой салфеткой удаляют с призмы рефрактометра сыворотку, протирают ватой, смоченной спиртово-эфирной смесью, и исследуют следующую пробу. Стеклянную палочку промывают в дистиллированной воде и обсушивают марлей.

3.7. Расчёты результатов

3.7.1. Содержание белка в исследуемых пробах (в %) определяют по таблице I.

3.7.2. Если температура в камере во время отсчета не соответствует 20°С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой - прибавляют.

3.8. Ошибка метода

При хранении сыворотки в холодильнике в течение 3-4 дней ошибка метода не превышает ±1%.

3.9. Время, необходимое для проведения исследования

На одно исследование затрачивается 1-2 мин. Среднее количество исследований в день составляет 150 проб.

3.10. Физиологические пределы

3.10.1. Содержание общего белка в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2 (стр. 83).

3.10.2. Содержание белка в сыворотке крови здоровых животных стабильно. Отклонения уровня белка от нормы свидетельствуют о глубоких нарушениях обмена веществ в организме животных.

3.10.3. Снижение содержания белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) характеризует длительный недокорм, белковое голодание, плохое усвоение протеина из кормов вследствие хронических расстройств желудочно-кишечного тракта, заболеваний печени, дефицита углеводов, макро- и микроэлементов и витаминов в рационе.

3.10.4. Повышение уровня белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) наблюдают при высококонцентратном типе кормления, заболеваниях печени (гепатиты, дистрофия), желудочно-кишечного тракта.

3.11. Источники литературы

3.11.1. Лабораторные исследования в ветеринарии. Изд-во "Колос", М., 1971, 420-423.

3.11.2. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии. Изд-во "Просвещение", 1975, 307.

Таблица I

Содержание белка в сыворотке крови
в зависимости от коэффициента рефракции

Показания рефрактометра	Белок (%)	Показания рефрактометра	Белок (%)	Показания рефрактометра	Белок (%)
I.3450	5.25	I.3480	7.00	I.35I0	8.74
I.345I	5.3I	I.348I	7,05	I.35II	8.80
I.3452	5.37	I.3482	7.II	I.35I2	8.86
I.3453	5.43	I.3483	7.I7	I.35I3	8.9I
I.3454	5.48	I.3484	7.23	I.35I4	8.97
I.3455	5.54	I.3485	7.29	I.35I5	9.03
I.3456	5.60	I.3486	7.34	I.35I6	9.09
I.3457	5.66	I.3487	7.40	I.35I7	9.I5
I.3458	5.72	I.3488	7.46	I.35I8	9.20
I.3459	5.77	I.3489	7.52	I.35I9	9.26
I.3460	5.83	I.3490	7.58	I.3520	9.32
I.346I	5.89	I.349I	7.63	I.352I	9.38
I.3462	5.95	I.3492	7.69	I.3522	9.44
I.3463	6.0I	I.3493	7.75	I.3523	9.50
I.3464	6.07	I.3494	7.8I	I.3524	9.55
I.3465	6.I2	I.3495	7.87	I.3525	9.6I
I.3466	6.I8	I.3496	7.93	I.3526	9.67
I.3467	6.24	I.3497	7.98	I.3527	9.73
I.3468	6.30	I.3498	8.04	I.3528	9.79
I.3469	6.36	I.3499	8.I0	I.3529	9.84
I.3470	6.4I	I.3500	8.I6	I.3530	9.90
I.347I	6.47	I.350I	8.22	I.353I	9.96
I.3472	6.53	I.3502	8.27	I.3532	I0.02
I.3473	6.59	I.3503	8.33	I.3533	I0.08
I.3474	6.65	I.3504	8.39	I.3534	I0.I3
I.3475	6.70	I.3505	8.46	I.3535	I0.I9
I.3476	6.76	I.3506	8.5I	I.3536	I0.25
I.3477	6.82	I.3507	8.57	I.3537	I0.3I
I.3478	6.88	I.3508	8.62	I.3538	I0.37
I.3479	6.94	I.3509	8.68	I.3539	I0.43

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИИ

4.1. Принцип метода

Белки реагируют в щелочной среде с сернокислой медью с образованием соединений фиолетового цвета.

4.2. Реактивы

4.2.1. Биуретовый реактив основной. 4,5 г калия-натрия виннокислого, 4-водного растворяют в 40 мл 0,2 н раствора едкого натра. После растворения прибавляют 1,5 г сернокислой 5-водной меди и 0,5 г йодистого калия. Перемешивают до полного растворения и доводят до 100 мл в мерной колбе 0,2 н раствором едкого натра. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стоек.

4.2.2. 0,2 н раствор едкого натра. 8 г вещества вносят в мерную колбу на 1 л и приливают до метки дистиллированной воды.

4.2.3. 0,5-ный раствор йодистого калия в 0,2 н растворе едкого натра. 2,5 г йодистого калия вносят в мерную колбу на 500 мл и доливают до метки 0,2 н раствором едкого натра. Хранят в посуде из темного стекла не более 2-х недель.

4.2.4. Рабочий раствор биуретового реактива. Смешивают 1 часть основного биуретового реактива (п.4.2.1.) с 4-мя частями 0,5%-ного раствора йодистого калия (п.4.2.3.). Хранят не более 2-х недель в холодильнике.

4.2.5. 0,9%-ный раствор хлористого натрия. Берут 0,9 г хлористого натрия и растворяют в 91,9 мл дистиллированной воды.

4.2.6. Стандартный раствор альбумина. В пробирку вносят 1 г кристаллического сывороточного (или плацентарного) альбумина и 9 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия. Тщательно перемешивают. 1 мл раствора содержит 0,1 г белка. Хранят в холодильнике.

4.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

4.3.1. Калий-натрий виннокислый,4-водный, чда - 4,5 г.
4.3.2. Медь сернокислая,5-водная, хч, чда - 1,5 г.
4.3.3. Калий йодистый, хч, чда - 2,5 г.
4.3.4. Натр едкий, хч, чда - 4,0 г.
4.3.5. Альбумин сывороточный или плацентарный - 1,0 г.
4.3.6. Натрий хлористый - 0,9 г.

4.4. Специальное оборудование и аппаратура

4.4.1. Фотоэлектроколориметр.
4.4.2. Холодильник бытовой.
4.4.3. Химические пробирки.
4.4.4. Пипетки на 0,1, 1 и 5 мл.
4.4.5. Мерные колбы на 100, 500 и 1000 мл.
4.4.6. Миллиметровая бумага.
4.4.7. Центрифужные пробирки.
4.4.8. Термостат.

4.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови (пп. 2.1., 2.2., 2.3., 2.4.).

4.6. Ход определения

4.6.1. К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл рабочего биуретового реактива и смешивают избегая образования пены.

4.6.2. Через 30 мин (не позднее чем через час) измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540-560 нм (зеленый светофильтр) против контроля, в котором сыворотку заменяют 0,1 мл 0,9%-ного раствора хлористого натрия.

4.7. Расчеты результатов

4.7.1. Расчет производится по калибровочному графику.

Схема для построения калибровочного графика

№№ проб	Стандартный раствор альбумина	0,9%-ный раствор хлористого натрия	Концентрация белка, %
1	0.4 мл	0,6 мл	4
2	0,6 мл	0,4 мл	6
3	0,8 мл	0,2 мл	8
4	1,0 мл	-	10

4.7.2. Из каждого разведения вносят в 3-4 пробирки (не менее) по 0,1 мл раствора альбумина и обрабатывают как и сыворотку крови. По полученным средним данным из 3-4 измерений строят калибровочную кривую.

4.7.3. Если в сыворотке крови содержится более IO% белка, то ее разводят физиологическим раствором в соотношении I:I, результат умножают на 2.

4.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ∓2,0%.

4.9. Время необходимое для проведения исследования

В день один исследователь проводит IOO анализов.

4.IO. Источники литературы

4.IO.I. Weishselbaum T. Am.S.Clin.Path.I946, IO, 49, I946, I6, 40.

4.IO.2. Deutsches Arzneibuch, 7 Ausgabe, Diagnostischem Laboratoriums methoden, Berlin, I968.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

5.I. Принцип метода

Отдельные фракции белка способны осаждаться фосфатными растворами определенной концентрации.

5.2. Реактивы

5.2.I. Основной фосфатный раствор : 33,5 г едкого натра растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 226,8 г фосфорнокислого калия однозамещенного. После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл.

5.2.2. Рабочие фосфатные растворы. Из основного раствора берут в мерные колбы на IOO мл: 92,4 мл (№ I), 74,9 мл (№ 2), 58,8 мл (№3), 48,7 мл (№ 4) и доводят дистиллированной водой до метки, тщательно размешивают путем встряхивания При хранении добавляют по I капле хлороформа на IOO мл раствора.

5.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

5.3.1. Натр едкий, хч - 100 г.
5.3.2. Калий фосфорнокислый однозамещенный, хч, чда - 600 г.
5.3.3. Хлороформ для наркоза - 10 мл.

5.4. Специальное оборудование и аппаратура

5.4.1. Фотоэлектроколориметр.
5.4.2. Химические пробирки.
5.4.3. Пипетки на 1, 2, 5, 10 мл.
5.4.4. Бюретка на 100 мл.
5.4.5. Мерные колбы на 100 и 500 мл.
5.4.6. Холодильник бытовой.
5.4.7. Пробирки химические.

5.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови (пп. 2.1., 2.2., 2.3., 2.4.).

5.6. Ход определения

5.6.1. Устанавливают в штативе 6 пробирок на каждую пробу, обозначив их цифрами 0, 1, 2, 3, 4, 5.
5.6.2. В пробирку № 0 вносят 10 мл дистиллированной воды, в пробирки 1, 2, 3, 4 - по 5 мл соответствующих рабочих фосфатных растворов.
5.6.3. В пробирку № 5 вносят 0,5 мл сыворотки крови, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора, закрывают пробкой и перемешивают путем перевёртывания 5-6 раз, после чего переносят по 0,5 мл смеси в пробирки №№ 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку № 0.
5.6.4. Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха и через 15 мин определяют оптическую плотность (ОП) растворов в пробирках 1, 2, 3, 4 против контроля (№0) на ФЭКе при красном светофильтре в кювете шириной 1 см. Измерения оптической плотности проводят в обратной последовательности, сначала в пробирке № 4, а затем в пробирках №№ 3, 2 и 1.

5.7. Расчеты результатов

5.7.1. Расчет производится по схеме:

ОП пробирки №I - ОП пробирки №2 = ОП альбуминов,
ОП пробирки №2 - ОП пробирки №3 = ОП α-глобулинов,
ОП пробирки №3 - ОП пробирки №4 = ОП β-глобулинов,
ОП пробирки №4 = ОП γ-глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых фракций за I00%, вычисляют содержание каждой фракции в относительных процентах.

Зная концентрации общего белка можно произвести перерасчет в абсолютные величины.

5.7.2. Пример расчета:

ОП пробирки №I =0,800; ОП пробирки №2 = 0,400;
ОП пробирки №3 =0,300; ОП пробирки №4 = 0,200;
тогда ОП альбуминов = 0,800 - 0,400 = 0,400;
ОП α-глобулинов = 0,400 - 0,300 = 0,I00;
ОП β-глобулинов = 0,300 - 0,200 = 0,I00;
ОП γ-глобулинов = 0,200;

$$\text{относительный \% альбуминов} = \frac{0{,}400 \times I00}{0{,}800} = 50\%;$$

$$\alpha\text{-глобулинов} = \frac{0{,}I00 \times I00}{0{,}800} = I2{,}5\%;$$

$$\beta\text{-глобулинов} = \frac{0{,}I00 \times I00}{0{,}800} = I2{,}5\%;$$

$$\gamma\text{-глобулинов} = \frac{0{,}200 \times I00}{0{,}800} = 25\%.$$

5.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±4%.

5.9. Время необходимое для проведения исследования

Время на одно исследование 20-25 мин. При серийных исследованиях в день один лаборант проводит 30 анализов.

5.I0. Физиологические пределы

5.I0.I. Определение белковых фракций позволяет провести дифференциацию отдельных видов гипо- и гиперпротеинемии, а также выявить профиль белковых фракций сыворотки крови при ряде заболеваний и состояний, не сопровождающихся изменениями общего содержания белка.

5.I0.2. Снижение альбуминов наблюдается при острых воспалительных процессах, поздних стадиях пневмонии, нефрозах и нефритах, токсикозах беременности, злокачественных новообразованиях кроветворного и лимфатического аппарата, при гепатитах, циррозах печени.

5.I0.3. Уменьшение альбуминов при одновременном увеличении β- глобулинов и γ - глобулинов отмечается при гепатитах. Для цирроза характерно снижение альбуминов и резкое увеличение γ- глобулинов. Изменение белковых фракций обусловливают диспротеинемию, выражением которой является белковый коэффициент (отношение между количеством альбуминов и суммой глобулинов). В норме оно составляет 0,9 - I,4.

5.II. Источники литературы

5.II.I. Вургафт К.И. Из практики применения экспресс-метода определения белковых фракций сыворотки крови.- Лаб. дело, I973, № I2, с. 75I-752.

5.II.2. Карпюк С.А. Определение белковых фракций сыворотки крови экспресс-методом.-Лаб. дело, I962, № 7, с. 33-36.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ

6.I. Принцип метода

Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и ионов железа окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в сыворотке крови.

6.2. Реактивы

Используется набор реактивов для определения содержания мочевины в сыворотке крови фирмы "Лахема" ЧССР на I50 анализов.

6.2.I. Основной раствор реагента. Имеющуюся в наборе таблетку, содержащую диацетилмонооксим, тиосемикарбазид и соль железа растворяют в 30 мл дистиллированной воды при умеренном нагревании в мерной колбе емкостью 50 мл и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. Наличие небольшого осадка не мешает определению. Устойчив в

течение нескольких недель при комнатной температуре.

6.2.2. Раствор серной кислоты. В мерную колбу на 250 мл при перемешивании вносят примерно I50 мл дистиллированной воды и 25 мл 96%-ной серной кислоты (хч или чда). После охлаждения доводят до метки дистиллированной водой. Устойчив неограниченное время.

6.2.3. Рабочий раствор реагента. Смешивают растворы основного реагента и серной кислоты в соотношении I:I. Готовится в день проведения анализов.

6.2.4. 5%-ный раствор ТХУ.

6.2.5. Стандартный раствор мочевины 25 мг%

6.3. Специальное оборудование и аппаратура

6.3.I. Фотоэлектроколориметр.

6.3.2. Водяная баня.

6.3.3. Пипетки на 0,I, I,0 и 2,0 мл.

6.3.4. Мерные колбы на 50 и 250 мл.

6.3.5. Стеклянные палочки.

6.3.6. Алюминиевая фольга.

6.3.7. Пробирки химические.

6.4. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови (пп. 2.I,2.2.,2.3.,2.4.).

6.5. Ход определения

6.5.I. Для осаждения белка к I мл 5%-ного раствора ТХУ прибавляют 0,I мл сыворотки крови, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют I5-20 мин при 2000-3000 об/мин.

6.5.2. К 0,2 мл надосадочной жидкости приливают 2 мл рабочего раствора реагента и перемешивают.

6.5.3. Пробирки закрывают резиновыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и нагревают на кипящей водяной бане 10 мин (точно).

6.5.4. Охлаждают в струе водопроводной воды в течение 2-3 мин и измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля (2 мл рабочего раствора реагента и 0,I мл 5%-ного раствора ТХУ), обработанного аналогичным образом. Измерения проводят в кювете, толщиной слоя 0,3 см при длине волны 525 нм (светофильтр №6) не позднее, чем через I5 мин после охлаждения. Окраска неустойчива.

6.5.5. Одновременно с серией проб (оптимальное количество 20) в 3-4 экземплярах обрабатывают стандартный раствор мочевины (25 мг%) как и сыворотку крови.

6.6. Расчеты результатов

По полученным величинам оптической плотности пробы (А) и средних показателей по 3-4 измерениям стандарта (Б) рассчитывают концентрацию мочевины в пробе по формуле:

$$C\ мг\% = \frac{A}{B} \times 25$$

6.7. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±4%.

6.8. Количество определений в день

В течение рабочего дня один исследователь проводит I00 анализов.

6.9. Физиологические пределы

6.9.I. Содержание мочевины в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2.

6.9.2. Повышение мочевины в сыворотке крови наблюдается при белковом перекорме, при дефиците легкоперевариемых углеводов в рационе, при скармливании большого количества карбамида, при заболевании печени и почек.

6.9.3. Снижение уровня мочевины в сыворотке крови свидетельствует о недостатке протеина в рационе.

6.I0. Источники литературы

6.I0.I. Инструкция к набору "Биотест мочевина" ЧССР.

6.I0.2. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. М.,I973, 66-69.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ ПО ЦВЕТНОЙ РЕАКЦИИ С ОРТО-ТОЛУИДИНОМ

7.I. Принцип метода

Глюкоза при нагревании с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты образует соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации глюкозы.

7.2. Реактивы

7.2.I. Орто-толуидин (ч)-желтого цвета, обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при 200°С (на песочной бане). Свежеприготовленный орто-толуидин должен быть бесцветным или слабо-желтого цвета. Экстинция при 590-655 нм против воды не должна превышать 0,02. Реактив стоек при хранении в посуде из темного стекла, без доступа воздуха.

7.2.2. Ледяная уксусная кислота, хч.

7.2.3. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г ТХУ и добавляют 80 мл дистиллированной воды.

7.2.4. Тиомочевина, чда.

7.2.5. 0,2%-ный раствор бензойной кислоты. 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 99,8 мл дистиллированной воды. Для более быстрого растворения нагревают на водяной бане.

7.2.6. Орто-толуидиновый реактив. В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,I5 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто-толуидина. Реактив стоек при хранении в холодильнике.

7.2.7. Стандартный раствор глюкозы. 50 мг глюкозы, высушенной в сушильном шкафу до постоянного веса при температуре +I00° С, растворяют в I00 мл 0,2%-ного раствора бензойной кислоты.

7.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

7.3.I. Орто-толуидин, ч - 30 мл.

7.3.2. Ледяная уксусная кислота, хч - 470 мл.

7.3.3. Трихлоруксусная кислота, чда - I00 г.

7.3.4. Тиомочевина, чда - I г.

7.3.5. Глюкоза, ч - 0,I г.

7.3.6. Бензойная кислота, чда - 0,2 г.

7.4. Специальное оборудование и аппаратура

7.4.I. ФЭК-56 или др.

7.4.2. Сушильный шкаф.

7.4.3. Колба-реторта.

7.4.4. Песочная баня.

7.4.5. Колбы мерные на I00 мл.

7.4.6. Лабораторный автотрансформатор.

7.4.7. Центрифуга.

7.4.8. Водяная баня.

7.4.9. Пробирки химические.

7.4.I0. Пробирки центрифужные.
7.4.II. Термометр лабораторный на I50°С.
7.4.I2. Штативы для пробирок.
7.4.I3. Холодильник бытовой.
7.4.I4. Термос на 3-5 л.

7.5. Материал для исследования

Материалом служит безбелковый фильтрат крови полученный путем смешивания и последующего центрифугирования равных объемов 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и цельной крови.

7.6. Ход определения

7.6.I. В пробирку вносят 0,2 мл безбелкового фильтрата крови, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива.

7.6.2. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 минут, после чего охлаждают до комнатной температуры под водопроводной водой.

7.6.3. Фотометрируют против контроля при длине волны 590-655 нм, в кювете толщиной I0 мм.

7.6.4. В контрольную пробирку вносят 0,I мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и 0,4 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового раствора .

7.6.5. Стандартная проба. Стандартные пробы ставят как опытные, но вместо безбелкового фильтрата берут 0,I мл глюкозы с концентрацией 50 мг%, 0,I мл 20%-ного раствора ТХУ, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива.

7.7. Расчеты результатов проводят по формуле:

$$C_{оп} = C_{ст} \cdot \frac{E_{оп}}{E_{ст}}, \text{ где}$$

$C_{оп}$ - концентрация глюкозы в пробе, мг/%;

$C_{ст}$ - концентрация глюкозы в стандарте, мг/%;

$E_{оп}$ - оптическая плотность пробы;

$E_{ст}$ - оптическая плотность стандарта.

7.8. Ошибка метода составляет ∓2,5%.

7.9. Количество определений в день

В течение рабочего дня один исследователь

производит I00 определений.

7.I0. Физиологические пределы

7.I0.I. Содержание глюкозы в крови животных представлено в таблице 2.

7.I0.2. Снижение глюкозы в крови (гипогликемия) бывает при недостаточности микроэлементов в организме, легкоусвояемых углеводов в рационе, при кетозе, остеодистрофии, ацидозе, гипокинезии.

7.I0.3. Повышение глюкозы в крови (гипергликемия) наблюдается при поражении эндокринной системы, недостаточной продукции инсулина, скармливании больших количеств свеклы, патоки, при сильном возбуждении животного.

7.II. Источники литературы

7.II.I. Zander R. Clin. Chim. Acta, 8, 1963, 351.

7.II.2. Масленников В.Д., Михеева А.И. Лабораторное дело,1970, I0, 588.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ СОМОДЖИ

8.I. Принцип метода

Метод основан на окислении глюкозы в щелочной среде при кипячении с сернокислой медью. При йодометрическом определении образовавшаяся закись меди окисляется йодом. Последний освобождается подкислением определенного количества йодноватокислого калия и йодистого калия, а оставшийся свободный йод оттитровывается гипосульфитом.

8.2. Реактивы

8.2.I. 5%-ный раствор сернокислого цинка. Берут 5 г сернокислого цинка,7-водного и растворяют в 95 мл дистиллированной воды.

8.2.2. 0,3 н раствор едкого натра. Берут I2 г едкого натра (чда, хч) и растворяют в 700 мл дистиллированной воды, охлаждают и водой доводят раствор в мерной колбе до I л. Растворы 8.2.I. и 8.2.2. должны нейтрализовать друг друга объем в объем. Последнее проверяется медленным титрованием с индикатором фенолфталеином.

8.2.3. Реактив Сомоджи.

а) медь сернокислая, 5-водная, чда, хч - 8 г;
б) натрий углекислый безводный, чда, хч - 30 г;
в) калий-натрий виннокислый, 4-водный, чда - 30 г;
г) калий йодистый, чда, хч - 5 г;
д) натрий сернокислый безводный, чда, хч - 180 г;
е) натр едкий, хч, I н раствор - 40 мл;
ж) калий йоноватистокислый I н раствор, чда, хч - 5 мл.

Углекислый натрий и сегнетову соль растворяют в 200 мл горячей воды, добавляют раствор едкого натрия, перемешивают, после чего раствор кипятят для удаления CO_2. Сернокислый натрий растворяют в 500 мл горячей воды и нагревают до кипения. Оба раствора смешивают и добавляют йодистый калий, предварительно растворенный в малом количестве воды. Затем вливают раствор йоноватистокислого калия и после охлаждения доливают водой в мерной колбе до I л. Через несколько дней раствор фильтруют. Реактив рекомендуется держать при комнатной температуре, не подвергая его действию солнечного света. Если температура ниже 20°С и выпадают кристаллы сернокислого натрия, то перед употреблением реактив необходимо немного подогреть и растворить осадок.

8.2.4. 2 н раствор серной кислоты. Берут 56 мл концентрированной серной кислоты (уд.вес - 1,84) и доводят объемом водой в мерной колбе до I л.

8.2.5. 0,005 н раствор натрия серноватокислого 5-водного, чда, (готовится перед анализом из 0,I н раствора, приготовленного из фиксанала).

8.2.6. I%-ный раствор крахмала, приготовленный в насыщенном растворе хлористого натрия.

8.2.7. Насыщенный раствор хлористого натрия.

8.2.8. I%-ный спиртовый раствор фенолфталеина.

8.2.9. Спирт этиловый.

8.2.10. Натрий фтористый.

8.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

8.3.I. Цинк сернокислый, 7-водный, чда - 20 г.

8.3.2. Натр едкий - 20 г.

8.3.3. Спирт этиловый - I00 мл.

8.3.4. Серная кислота, хч, концентрированная (уд.вес I,84)-56 мл.
8.3.5. Крахмал растворимый - I г.
8.3.6. Натрий хлористый - I00 г.
8.3.7. Фенолфталеин - I г.
8.3.8. Медь сернокислая, 5-водная, чда, хч - 4 г.
8.3.9. Натрий углекислый безводный, чда, хч - I5 г.
8.3.I0. Калий-натрий виннокислый, 4-водный, чда - I5 г.
8.3.II. Калий йодистый, чда, хч - 2,5 г.
8.3.I2. Натрий сернокислый безводный, чда, хч - 90 г.
8.3.I3. Калий йодноватокислый фиксанал 0,I н - I шт.
8.3.I4. Натрий фтористый - 5 г.
8.3.I5. Натрий серноватокислый, 5-водный ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) натрий тиосульфат, гипосульфит, чда, фиксанал - I шт.

8.4. Специальное оборудование и аппаратура

8.4.I. Сахарные пробирки 2,0-2,5хI5 см.
8.4.2. Водяная баня.
8.4.3. Микробюретка на 5 мл.
8.4.4. Мерные колбы на I000 мл.
8.4.5. Колбы из термостойкого стекла на 500 и I000 мл.
8.4.6. Холодильник шаровой
8.4.7. Термос на 3-5 л.
8.4.8. Центрифуга.
8.4.9. Штативы для пробирок.
8.4.I0. Пробирки химические.

8.5. Материалы для исследования

8.5.I. Материалом служит стабилизированная фтористым натрием кровь.
8.5.2. Осаждение белков. Одна часть крови гемолизируется в пяти частях воды и смешивается с двумя частями 0,3 н раствора едкого натра, двумя частями 5%-ного раствора сернокислого цинка. Тщательно перемешивают и через 30 мин центрифугируют при I500 об/мин в течение I0 мин. Фильтрат сливают в другую пробирку. Изменяя соотношение воды и крови можно получить безбелковый фильтрат меньшей концентрации.
8.5.3. При хранении крови концентрация глюкозы снижается, поэтому осаждение белка необходимо производить сразу после взятия крови или же после стабилизации фтористым натрием.

Кровь необходимо по возможности быстрее доставлять в термосе со льдом в лабораторию, где получают безбелковый фильтрат, который может храниться в морозилке холодильника не более 5 дней.

8.6. Ход определения

8.6.I. В пробирку для анализа берут 5 мл прозрачного безбелкового фильтрата крови и 5 мл реактива Сомоджи, тщательно перемешивают и помещают на I5 минут в кипящую банк. Охлаждают до комнатной температуры.

8.6.2. После охлаждения содержимое пробирки подкисляют 2,5-3,0 мл 2 н серной кислоты. Чтобы подкисление пробы произошло одновременно, рекомендуется добавлять кислоту быстро, встряхивая пробирку.

8.6.3. Затем в пробирку вносят 2-3 капли I%-ного раствора крахмала, перемешивают.

8.6.4. Титруют из микробюретки 0,005 н раствором гипосульфита до исчезновения синей окраски.

8.6.5. Контроль делают как опыт, но вместо фильтрата крови используют 5 мл воды.

8.7. Расчеты результатов

Расчет результатов ведут по формуле:

$X = (A - B).30$, где

X - концентрация глюкозы, мг%;,

A - количество мл 0,005 н раствора гипосульфита, затраченное на титрование контрольной пробы, мл;

B - количество мл 0,005 н раствора гипосульфита, затраченное на титрование опытной пробы, мл.

8.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ∓5%.

8.9. Количество определений в день составляет 50 проб.

8.I0. Физиологические пределы (см.7.I0.)

8.II. Источники литературы

8.II.I. Лабораторные исследования в ветеринарии, М., I97I, 428-430.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ (ВАРИАНТ 2)

9.1. Принцип метода

Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и ионов железа в кислой среде окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации мочевины в сыворотке крови.

9.2. Реактивы

9.2.1. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

9.2.2. 2,5%-ный раствор диацетилмонооксима. 250 мг вещества растворяют в 9,75 мл бидистиллированной воды. Реактив стоек.

9.2.3. 0,25%-ный раствор тиосемикарбазида (или 0,32%-ный раствор тиосемикарбазида солянокислого). Реактивы устойчивы при хранении в посуде из темного стекла.

9.2.4. Основной раствор хлорного железа. 5 г хлорного железа растворяют и доводят дистиллированной водой до 100 мл, затем прибавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.

9.2.5. Рабочий раствор хлорного железа. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного раствора хлорного железа и доводят дистиллированной водой до метки, затем прибавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Годен не более двух недель при хранении в посуде из темного стекла.

9.2.6. Цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбазида. Цветной реактив готовят каждый раз перед проведением анализов .

9.2.7. Серная кислота концентрированная (уд. вес 1,84)

9.2.8. Фосфорная кислота орто, 85%-ная.

9.2.9. Стандартный раствор мочевины - 25 мг%. Берут 250 мг

мочевины, высушенной в сушильном шкафу при 105°С до постоянного веса и растворяют в мерной колбе на I л дистиллированной водой.

9.2.10. Алюминевая фольга.

9.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

9.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч - 10 г.
9.3.2. Железо хлорное (железо треххлористое), 6-водное, хч, чда - 0,5 г.
9.3.3. Серная кислота концентрированная, хч, уд.вес 1,84 - 25 мл.
9.3.4. Мочевина, осч, чда, - 0,25 г.
9.3.5. Диацетилмонооксим ч, - 0,3 г.
9.3.6. Тиосемикарбазид, чда - 0,4 г.
9.3.7. Фосфорная кислота, орто, хч, чда - 3 мл, 85%-ная.

9.4. Специальное оборудование и аппаратура

9.4.1. Фотоэлектроколориметр
9.4.2. Водяная баня.
9.4.3. Центрифуга.
9.4.4. Центрифужные пробирки.
9.4.5. Пробирки химические.
9.4.6. Мерные колбы.
9.4.7. Пипетки измерительные на 0,2, 1, 5, и 10 мл.
9.4.8. Сушильный шкаф.

9.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

9.6. Ход определения

9.6.1. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки крови и 1 мл 10%-ного раствора ТХУ. Перемешивают и оставляют на 15-20 мин.
9.6.2. Центрифугируют 15-20 мин при 2000-3000 об/мин.
9.6.3. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости и прибавляют 5 мл цветного реактива.
9.6.4. Пробирку с пробой закрывают резиновой пробкой, обёрнутой алюминевой фольгой, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 минут (точно) и затем охлаждают в течение 2-3 мин под струей водопроводной воды.

9.6.5. Измерение проводят на фотоэлектроколориметре при зеленом светофильтре (№ 6) в кювете I см против контроля не позднее, чем через I5 мин после охлаждения.

9.6.6. Контроль ставят как и опытную пробу, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды.

9.3.7. Одновременно проводят исследование в стандартной пробе. Стандартная проба обрабатывается аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

9.7. Расчеты результатов

По полученным величинам оптической плотности опытной пробы (А) и стандарта (В) рассчитывают концентрацию мочевины в пробе по формуле:

$$\text{Мочевина, мг\%} = \frac{A}{B} \cdot 25$$

9.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ∓4%.

9.9. Количество определений в день

В течение рабочего дня один исследователь проводит I00 анализов.

9.IC. Физиологические пределы

Смотри пункт 6.9.

9.II. Источники литературы

Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. М., I973, 66-69.

IO. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО БАУМАН

IO.I. Принцип метода

Метод основан на свойстве липидов окрашиваться суданом черным. После извлечения краски оптическую плотность ее определяют фотометрически и содержание липидов вычисляют по стандартной кривой.

IO.2. Реактивы

IO.2.I. Насыщенный раствор судана черного (0,3 г судана черного в I00 мл этилового спирта).
IO.2.2. Абсолютный этиловый спирт.
IO.2.3. Уксусная кислота ледяная (хч).
IO.2.4. Смесь абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты 4:I.
IO.2.5. Стандартный раствор: 0,2 г холестерина или 0,2 г трибутирина или триолеина в I00 мл абсолютного спирта.
IO.2.6. Бумага хроматографическая "медленная".

IO.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

IO.3.I. Судан черный - 0,I г.
IO.3.2. Абсолютный этиловый спирт - 250 мл.
IO.3.3. Уксусная кислота ледяная - 300 мл.
IO.3.4. Холестерин кристаллический - 0,5 г.

IO.4. Специальное оборудование и аппаратура

IO.4.I. ФЭК-56, ФЭК-М и др.
IO.4.2. Рамка для натягивания бумажных полосок.
IO.4.3. Пробирки центрифужные.
IO.4.4. Пипетки градуированные на 0,I и I,0 мл.

IO.5. Материал для исследования

Материалом служит негемолизированная сыворотка крови.

IO.6. Ход определения

IO.6.I. В центрифужную пробирку вносят I мл сыворотки, 0,I мл раствора судана черного, осторожно перемешивают и дают стоять 30 минут.
IO.6.2. Центрифугируют 20 минут при 2000-3000 об/мин.
IO.6.3. Окрашенную сыворотку ливают в пробирку с притертой пробкой и хранят в холодильнике.

10.6.4. Наносят на хроматографическую бумагу, натянутую на специальную раму, по 0,33 мл окрашенной сыворотки и высушивают в темном месте.

10.6.5. После высушивания окрашенный участок разрезают на мелкие кусочки и помещают в пробирку.

10.6.6. В пробирку вносят смесь абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты по 3 мл и элюируют в течение I часа, периодически тщательно встряхивая.

10.6.7. Элюат переносят в кювету толщиной слоя 0,5 см и фотометрируют при красном светофильтре (длина волны 650 нм против элюирующей смеси.

10.7. Расчеты результатов

Содержание общих липидов в сыворотке крови вычисляют по калибровочной кривой, построенной по результатам измерений стандартных растворов холестерина (трибутирина, триолеина) разной концентрации.

10.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $\leq 5\%$.

10.9. Время, необходимое для проведения анализов

В течение рабочего дня один лаборант производит 100 анализов.

10.10. Физиологические пределы

Содержание общих липидов у клинически здоровых животных представлено в таблице I.

10.11. Источники литературы

I. Swahn B.S., Scand. J. Lab. Invest., 1953, 5,9.

2. Бауман Л.К. Лабораторное дело, 1961,11,30.

II. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА ПО ИЛЬКУ

11.1. Принцип метода

Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси уксусной и серной кислот даёт изумрудное зелёное окрашивание, интенсивность которого прямопропорциональна концентрации.

II.2. Реактивы

II.2.I. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и серной кислоты I:5:I. Бесцветная или слегка желтоватая. Хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

II.2.2. Стандартный раствор холестерина. Берут I00 мг холестерина, растворяют в 2 мл хлороформа в мерной колбе на I00 мл и доливают до метки абсолютный спирт. Раствор хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

II.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

II.3.I. Уксусная кислота, хч - 50 мл.
II.3.2. Уксусный ангидрид, чда - 250 мл.
II.3.3. Серная кислота, хч - 50 мл.

II.4. Специальное оборудование и аппаратура

II.4.I. Холодильник бытовой.
II.4.2. Фотоэлектроколориметр.
II.4.3. Термостат.
II.4.4. Колба мерная на I00 мл.
II.4.5. Пипетки на 0,2 мл и 5 мл.
II.4.6. Штатив для пробирок на 40 гнёзд.

II.5. Материал для исследования

Материалом служит негемолизированная сыворотка крови.

II.6. Ход определения

II.6.I. К 3 мл смеси уксусного ангидрида, уксусной и серной кислот прибавляют 0,I5 мл негемолизированной сыворотки.
II.6.2. Пробирку энергично встряхивают I0-I2 раз.
II.6.3. Ставят в термостат на 20 мин при температуре 37°С.
II.6.4. Фотометрируют против смеси, при красном светофильтре, в (630-690 нм) кювете с толщиной слоя 0,5 см.

II.7. Расчеты результатов

Расчет проводят по калибровочному графику, составленному по результатам измерений стандартных растворов холестерина разной концентрации. Рабочие стандартные растворы холестерина обрабатывают так же, как и опытные пробы.

II.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5%.

II.9. Время необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь проводит ⩾ 100 анализов.

II.10. Физиологические пределы

Содержание общего холестерина в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице I. Понижение или повышение уровня холестерина в сыворотке крови бывает при заболеваниях печени.

II.11. Источники литературы

II.11.1. Ilka S. Lsehr. inn. Med., 1962, 17, 2, 83.

II.11.2. Розенцвейг К.И. Лабораторное дело, 1962, 9, 43.

12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА КЕТОНОВЫХ ТЕЛ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

12.1. Принцип метода

Под действием серной кислоты кетоновые тела распадаются до ацетона. Последний соединяется с йодом, образуя комплексное соединение. При помощи гипосульфата свободный йод оттитровывают и по разности между контролем и опытом определяют связанный йод.

12.2. Реактивы

12.2.1. Биохроматная смесь - 5 г двухромовокислого калия тщательно смешивают с 50 мл концентрированной серной кислоты и 50 мл дистиллированной воды.

12.2.2. 30%-ный раствор серной кислоты.

12.2.3. 10%-ный раствор едкого натра.

12.2.4. 0,01 н раствор йода (готовится перед анализом из 1 н раствора, приготовленного из фиксанала).

12.2.5. 0,01 н раствор гипосульфита (готовится перед анализом из 1 н раствора, приготовленного из фиксанала).

12.2.6. 1%-ный раствор крахмала (сначала растворяют крахмал в небольшом количестве холодной дистиллированной воды, а затем доливают остальное количество и доводят до кипения).

12.2.7. 0,3 н раствор сухого натра.

12.2.8. 5%-ный раствор сернокислого цинка.

12.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

12.3.1. Калий двухромовокислый, чда - 50 г.
12.3.2. Серная кислота концентрированная, чда - 600 мл.
12.3.3. Натр едкий, хч - 25 г.
12.3.4. Раствор йода I н - 100 мл.
12.3.5. Раствор гипосульфита I н - 100 мл
12.3.6. Крахмал растворимый, ч - I г.
12.3.7. Цинк сернокислый, хч - 5 г.

12.4. Специальное оборудование и аппаратура

12.4.1. Прибор для определения кетоновых тел.
12.4.2. Электроплитки.
12.4.3. Микробюретки на 2 и 5 мл.
12.4.4. Стеклянные палочки.
12.4.5. Стаканчики химические на 75 и 100 мл.

12.5. Материал для исследования

Материалом служит безбелковый фильтрат крови.

12.6. Ход определения

12.6.1. Готовят безбелковый фильтрат крови по методу Самоджи. К 2 мл гепаринизированной крови добавляют 10 мл дистиллированной воды, 4 мл 0,3 н раствора едкого натра и 4 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка. Перемешивают стеклянной палочкой и через 30 мин центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 мин.

12.6.2. В приемный стаканчик наливают 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н раствора йода, 2 мл 10%-ного едкого натра и ставят под холодильник прибора, чтобы конец его погрузился в жидкость.

12.6.3. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 15 мл бихроматной смеси и 10-12 мл дистиллированной воды и кипятят 20 мин. Параллельно ставят контроль, где вместо фильтрата крови вносят 10 мл дистиллированной воды.

12.6.4. Колбу охлаждают, холодильник смывают небольшим количеством дистиллированной воды в приемный стаканчик.

12.6.5. Приемный стаканчик ставят в темное место на 15-20 мин, после чего быстро приливают (используя пипетку с отбитым концом) 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты (жидкость окрашивается в желтый цвет), добавляют 2-3 капли 1%-ного раствора крахмала (смесь приобретает сине-черный цвет) и титруют 0,01 н раствором гипосульфита до обесцвечивания.

I2.7. Расчеты результатов

Содержание общего количества кетоновых тел проводят по формуле:

$$X \text{ мг\%} = (A - B) . 0,25 . I00 \text{ , где}$$

X -количество кетоновых тел, мг%;

A -количество мл 0,0I н раствора гипосульфита, пошедшее на связывание свободного йода в контрольной пробе;

B -количество мл 0,0I н раствора гипосульфита, затраченное на связывание свободного йода в опытной пробе;

I мл 0,0I н раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона;

I00 - коэффициент перевода в мг%.

I2.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $5 \pm I$ %.

I2.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь проводит 28 анализов при наличии 6 перегонных аппаратов.

I2.I0. Физиологические пределы

I2.I0.I. Повышение кетоновых тел в крови (кетонемия) выше 6 мг% является одним из основных признаков предклинической формы кетоза и наблюдается при высококонцентратном типе кормления, при недостатке сена и корнеплодов, а также при скармливании коровам кислых недоброкачественных кормов (силоса, сенажа, жома, барды), содержащих большое количество масляной кислоты.

I2.I0.2. Кетонемия может быть и при нарушениях рубцового пищеварения вследствие дефицита в кормах микроэлементов, гиподинамии, а также при гиперфункции щитовидной железы, вследствие усиленного распада жиров, белков и углеводов.

I2.I0.3. При клинической форме кетоза содержание кетоновых тел в крови значительно возрастает и увеличивается выделение их с мочой и молоком (выше I0 мг%), что улавливается качественной пробой Лестраде.

I2.II. Источники литературы

Лабораторные исследования в ветеринарии. Изд-во "Колос" М, I97I, 430-432.

I3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

I3.I. Принцип метода

Мурексид при pH 10-I3 образует с кальцием соединение розового цвета. При добавлении трилона Б, последний образует с кальцием более прочное комплексное соединение и мурексид освобождается с восстановлением в точке эквивалентности первоначального фиолетового цвета.

I3.2. Реактивы

I3.2.I. 0,005 н раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон Б). 0,932 г вещества растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на I л и доводят до метки, добавляют несколько капель хлороформа или толуола. I мл такого раствора ЭДТА эквивалентен 0,I мг кальция.

I3.2.2. I.8 н раствор едкого натра. 7,2 г вещества растворяют в дистиллированной воде, после охлаждения объем доводят до I00 мл.

I3.2.3. Водный раствор индикатора мурексида (пурпурат аммония) содержащий в I мл I мг вещества. Готовят в день проведения анализов. Хранят в холодильнике не более 3 суток.

I3.2.4. Стандартный раствор углекислого кальция. 2,495 г предварительно высушенного до постоянного веса при температуре I05-II0°С углекислого кальция, помещают в колбочку на I50-200 мл, добавляют 20-25 мл воды и концентрированной соляной кислоты каплями до полного растворения вещества, Затем смесь нагревают до кипения, переносят в мерную колбу на I л и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки.I л содержит I мг кальция

I3.2.5. Установление титра ЭДТА. I мл 0,005 н раствора ЭДТА эквивалентен 0,I мг кальция, содержащемуся в 0,I мл стандартного раствора углекислого кальция . Берут 0,I мл стандартного раствора кальция , добавляют 9,3 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл I,8 н раствора едкого натра, 2 капли раствора индикатора мурексида и титруют до перехода розовой окраски в фиолетовую (окраска контроля). Проводят не менее 6 параллельных определений и вычисляют среднюю величину раствора ЭДТА. Титр ЭДТА равен единице,деленной на количество мл 0,005 н раствора ЭДТА,пошедшее на титрование 0,I мл стандартного раствора углекислого кальция.

I3.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I3.3.I. Этилендиаминтетрауксусная кислоты динатриевая соль (трилон Б, хелатон), чда - 0,I г.

I3.3.2. Натр едкий, хч - 3,2 г.

I3.3.3. Мурексид, чда - 0,I г.

I3.3.4. Кальций углекислый, безводный, хч - 0,25 г.

I3.4. Специальное оборудование и аппаратура

I3.4.I. Стаканчики химические.

I3.4.2. Пипетки на 0,I, I,0 и 2,0 мл.

I3.4.3. Колбы мерные на I00, 200 и I000 мл.

I3.4.4. Колбы конические из термостойкого стекла на I50-200 мл.

I3.4.5. Электроплитка.

I3.4.6. Микробюретки на 2,0 и I,0 мл.

I3.5. Материал для исследования

Материалом служит сыворотка крови.

I3.6. Ход определения

I3.6.I. В контрольный стаканчик вносят 9,4 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл I,8 н раствора едкого натра и 2 капли индикатора. Раствор окрашивается в фиолетовый цвет.

I3.6.2. В опытный стаканчик вносят 9 мл воды, 0,4 мл I,8 н раствора едкого натра, 0,4 мл сыворотки, 2 капли индикатора Появляется светло-розовая окраска.

I3.6.3. Опытную пробу ставят рядом с контролем и титруют по каплям 0,005 н раствором ЭДТА до восстановления цвета индикатора (окраска контроля).

I3.6.4. Индикатор вносят в опытные образцы и стандарт непосредственно перед титрованием. Через 5-6 определений ставят новый контроль.

I3.7. Расчеты результатов

Расчет проводится по формуле:

$$Ca, мг\% = \frac{п \cdot Т \cdot 0{,}I\ мг \cdot I00\ мл}{0{,}4\ мл}$$ или

Ca, мг% = п. Т. 25, где

п - количество мл раствора ЭДТА, пошедшее на титрование пробы;

Т - титр раствора ЭДТА;

25 - постоянный коэффициент.

I3.8. Ошибка метода

Ошибка метода при соблюдении описанных условий и соответствующих навыков составляет ≤ 5 %.

I3.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение дня один исследователь производит I50 анализов.

I3.I0. Физиологические пределы

I3.I0.I. Содержание общего кальция в сыворотки крови здоровых животных представлено в таблице I.

I3.I0.2. Концентрация кальция в сыворотке крови животных - величина довольно постоянная. Однако содержание его в сыворотке крови всё же изменяется в зависимости от уровня поступления его с кормами и клинического состояния животного.

I3.I0.3. Снижение содержания кальция в крови (гипокальцемия) наблюдают при длительном дефиците его в рационе или при плохом усвоении при недостатке витамина Д, протеина, углеводов и избытке фосфора и цинка. Гипокальцемия бывает при тяжелых формах остеодистрофии, пастбищной тетании, родильном парезе.

I3.I0.4. Повышение содержания кальция в крови (гиперкальциемия) встречается редко, например, при избытке йода в организме, гиперфункции паращитовидных желез, острой костной дистрофии, гипервитаминозе Д.

I3.I0.5. Определение кальция в сыворотке крови или плазме (показатели одинаковы) необходимо также для характеристики кальций-фосфорного соотношения.

I3.II. Источники литературы

I3.II.I. Луцкий Д.Я. К методике комплексометрического определения кальция в сыворотке крови. Ветеринария, I968, 3, I08.

I4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ С ВАНАДАТ-МОЛИБДАТНЫМ РЕАКТИВОМ

I4.I. Принцип метода

Фосфор в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибдатным реактивом образует лимонно-желтое окрашивание,

интенсивность которого пропорциональна его количеству в пробе.

I4.2. Реактивы

I4.2.I. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Берут 20 г ТХУ и растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

I4.2.2. Концентрированная серная кислота, хч.

I4.2.3. Раствор молибдата аммония. I00 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°С. После охлаждения приливают I00 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают, переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до I л. Хранится долго.

I4.2.4. Раствор ванадата аммония. 2,5 г растворяют в 500 мл кипящей воды. Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до I л. Реактив стоек.

I4.2.5. Реактив на фосфор. Готовят путем смешивания растворов молибдата и ванадата аммония в равных объемах. Реактив пригоден в течение 2-х месяцев.

I4.2.6. Стандартный раствор фосфора. 4,393 г однозамещенного фосфата калия, высушенного до постоянного веса в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, растворяют в I л дистиллированной воды. В I мл раствора содержится I мг фосфора. Из него готовят рабочий раствор путем разбавления в 50 раз (I мл до 50), который содержит 0,02 мг фосфора в I мл.

I4.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I4.3.I. Трихлоруксусная кислота, ч - 75 г

I4.3.2. Серная кислота концентрированная, хч - I0 мл

I4.3.3. Аммоний молибденовокислый, чда., хч - I= г

I4.3.4. Аммоний ванадиевокислый, чда - 0,3 г

I4.3.5. Калий фосфорнокислый однозамещенный, чда, хч - 4,5 г.

I4.4. Специальное оборудование и аппаратура

I4.4.I. Фотоэлектроколориметр.

I4.4.2. Колбы конические термостойкие на I000 мл.

I4.4.3. Колбы мерные на 50, I00, 500 и I000 мл.

I4.4.4. Электроплитка.

I4.4.5. Пипетки градуированные.

I4.4.6. Центрифуга.

I4.4.7. Штативы для пробирок.

I4.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания равных объемов гепаринизированной крови и 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и последующего центрифугирования.

I4.6. Ход определения

I4.6.I. К 0,5 мл безбелкового фильтрата крови приливают I,5 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор (I4.2.5) перемешивают и дают стоять 2 часа.

I4.6.2. Центрифугируют при I500-2000 об/мин в течение 5-I0 минут для осветления смеси.

I4.6.3. Фотометрируют при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной I см против контроля (2 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор).

I4.6.4. Для построения калибровочной кривой берут 0,5; I,0; I,5; 2,0 мл рабочего стандартного раствора (I4.2.6.), доводят до 2 мл дистиллированной водой, добавляют по 2 мл реактива на фосфор и далее поступают как и с пробами. По результатам 3-х параллельных измерений вычерчивают калибровочный график.

I4.7. Расчеты результатов

Расчет проводят по формуле:

$$P\ мг\% = C.4.I00$$, где

C - количество мг фосфора по калибровочному графику,

4 - разведение пробы крови;

I00- пересчет на I00 мл.

I4.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $4 \pm I\%$.

I4.9. Время, необходимое для проведения исследований.

В течение дня один исследователь производит I50 анализов.

I4.I0. Физиологические пределы

I4.I0.I. Содержание неорганического фосфора в безбелковом фильтрате цельной крови, плазмы или сыворотки одинаково, если последние отделены от форменных элементов

сразу после взятия пробы крови и фильтрат получен одновременно. Физиологические пределы представлены в таблице 7.

I4.I0.2. Снижение фосфора в крови (гипофосфатемия) наблюдают при избытке кальция и дефиците витамина Д в организме, малоконцентратном типе кормления, отсутствии фосфорных подкормок, хронической форме остеодистрофии.

I4.I0.3. Повышение уровня фосфора в крови (гиперфосфатемия) бывает при гипофункции паращитовидных желез, высококонцентратном типе кормления, острой форме остеодистрофии, повышенном поступлении в организм витамина Д.

I4.I0.4. При характеристике состояния фосфорно-кальциевого обмена необходимо учитывать как количественное содержание в крови неорганического фосфора и кальция, так и соотношение между этими элементами.

I4.II. Источники литературы

I4.II.I. Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л.А. Ветеринария, 7, 1972.

I4.II.2. Puls V.G. Landwirschaftliche Forschung, I4, II, 38-42.

I5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО МАГНИЯ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ С ТИТАНОВЫМ ЖЕЛТЫМ

I5.I. Принцип метода

Магний с титановым желтым в щелочной среде образует оранжево-красное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна его концентрации.

I5.2. Реактивы

I5.2.I. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г ТХУ и растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

I5.2.2. 0,0I%-ный раствор поливинилового спирта. Растворяют I00 мг в I л бидистиллированной воды при подогревании. Реактив стоек.

I5.2.3. 0,0I%-ный раствор титанового желтого. Реактив готовится в день анализа на бидистиллированной воде.

I5.2.4. 2 н раствор едкого натра. Растворяют 80 г вещества в I л бидистиллированной воды.

I5.2.5. Стандартный раствор магния. 0,I68 г прокаленной окиси магния растворяют сначала в 2,5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят бидистиллированной водой в

в мерной колбе до 100 мл. В 1 мл раствора содержится 1 мг магния. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор. Из основного стандартного раствора берут 1 мл и доводят в мерной колбе до 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл рабочего раствора содержится 0,01 мг магния.

15.3. Количество необходимых растворов на 100 анализов

15.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч - 25 г
15.3.2. Поливиниловый спирт, ч - 0,010 г
15.3.3. Титановый желтый, аммонийная соль, ч - 0,1 г
15.3.4. Натр едкий, хч - 20 г
15.3.5. Магний окись, чда - 1 г
15.3.6. Соляная кислота, концентрированная, хч - 3 мл

15.4. Специальное оборудование и аппаратура

15.4.1. Фотоэлектроколориметр.
15.4.2. Центрифуга.
15.4.3. Пробирки центрифужные.
15.4.4. Стаканчики химические на 50 мл.
15.4.5. Колбы мерные на 100 и 1000 мл.
15.4.6. Стеклянные палочки.

15.5. Материал для исследования

Материалом служит безбелковый фильтрат крови, полученный путем смешивания и последующего центрифугирования гепаринизированной крови и 20%-ного раствора ТХУ в равных объемах.

15.6. Ход определения

15.6.1. Вносят в стаканчик 0,5 мл безбелкового фильтрата крови, добавляют 1 мл 0,01%-ного раствора титанового желтого, 1 мл 0,01%-ного раствора поливинилового спирта, 15,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл 2 н раствора едкого натра.

15.6.2. Тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 6-10 мин фотометрируют при зеленом светофильтре в кювете с толщиной слоя 5 см против контроля.

15.6.3. В контрольную пробу вместо 0,5 мл фильтрата крови вносят 0,25 мл бидистиллированной воды и 0,25 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты.

I5.7. Расчеты результатов

I5.7.I. По результатам измерений стандартных растворов магния вычерчивают калибровочную кривую.

I5.7.2. Берут 0,I; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5, 0,75; I,0 мл рабочего стандартного раствора магния, анализируют и как и образцы крови. Общий объем до 20 мл доводят бидистиллированной водой.

I5.7.3. Расчет производят по формуле:

$$Mg, \text{мг\%} = \frac{x \cdot 2 \cdot 100}{n}$$; где

x – количество магния в мг по калибровочной кривой;

n – количество мл безбелкового фильтата крови, взятого на анализ;

2 – степень разведения крови;

I00 – пересчет на I00 мл крови.

I5.7.4. При H = 0,5 мл формула представляет следующее:

$$Mg, \text{мг\%} = x \cdot 400.$$

Пример: показания ФЭК соответствуют 0,002 мг магния по калибровочной кривой. Отсюда содержание неорганического магния в крови будет 0,002 . 400 = 0,8 мг%.

I5.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 3 ±I%.

I5.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь производит ≥ I00 анализов.

I5.I0. Физиологические пределы

I5.I0.I. Содержание неорганического магния в крови здоровых животных представлено в таблице 9.

I5.I0.2. Снижение содержания неорганического магния в крови (гипомагнемия) наблюдается при дефиците магния в организме, пастбищной тетании.

I5.I0.3. Повышение уровня неорганического магния в крови (гипермагнемия) бывает редко, например, при отравлениях солями магния.

I5.II. Источники литературы

Петрухин У.В. Труды Смоленской НИБС, I950, вып.I., I88-I99.

I6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИЕЙ

I6.I. Принцип метода

I6.I.I. При сгорании металлов возникает излучение, интенсивность которого зависит от концентрации элементов, содержащихся в растворе. На пути излучения ставятся светофильтры, пропускающие волну определенной длины. Свет, прошедший через светофильтр, попадает на селеновый фотоэлемент, где преобразуется в электрический ток, измеряемый гальванометром.

I6.I.2. Между концентрацией вещества, содержащегося в исследуемом растворе, и отклонением шкалы гальванометра имеется определенная связь, которая устанавливается путем анализа стандартных растворов с содержанием известного количества калия или натрия при определенном давлении газа и воздуха.

I6.2. Реактивы

I6.2.I. Стандартный раствор натрия основной. Берут 2,54I8 г хлористого натрия, высушенного до постоянного веса при температуре I05°С, и растворяют в I л дистиллированной воды. В I мл раствора содержится I мг натрия.

I6.2.2. Рабочие стандартные растворы натрия, содержащие I5,20 и 25 мг натрия в I литре. Для этого берут соответственно I,5; 2,0 и 2,5 мл основного стандартного раствора и доводят дистиллированной водой в мерных колбах на I00 мл до метки.

I6.2.3. Стандартный раствор калия основной. Берут I,9069 г хлористого калия, высушенного до постоянного веса при температуре I05°С, и растворяют в I л дистиллированной воды. В I мл раствора содержится I мг калия.

I6.2.4. Рабочие стандартные растворы калия, содержащие 5; 7,5; I0 и I5 мг калия в 1 литре. Для этого берут в мерные колбы на I00 мл соответственно 0,5; 0,75; I,0 и I,5 мл основного стандартного раствора калия, добавляют в каждую колбу по I5 мл основного стандартного раствора натрия (п.I6.2.I.) и доливают дистиллированной воды до метки.

I6.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I6.3.I. Натрий хлористый, хч - 2,6 г
I6.3.2. Калий хлористый, хч - 2,0 г

I6.4. Специальное оборудование и аппаратура

I6.4.I. Пламенный фотометр.
I6.4.2. Сушильный шкаф.
I6.4.3. Колбы мерные.
I6.4.4. Пипетки градуированные на I, 2, 5 и I0 мл.
I6.4.5. Бюретка измерительная на 50 мл.
I6.4.6. Пробирки химические.
I6.4.7. Флаконы пенициллиновые.

I6.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма, полученная в течение 4-х часов после отбора проб крови.

I6.6. Ход определения

I6.6.I. Для определения калия берут 0,5 мл плазмы и вносят в пенициллиновый флакончик, добавляют из бюретки 9,5 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой и путем перевертывания тщательно перемешивают. Разведение соответствует I:20.

I6.6.2. Для определения натрия плазму крови разводят I:I50, для чего берут I мл разведенной I:20 плазмы (п.I6.6.I.), вносят в другой флакончик и приливают 6,5 мл дистиллированной воды.

I6.6.3. Подготовка прибора к работе описана в инструкции, прилагаемой к прибору.

I6.6.4. Во время прогревания прибора в пламя горелки подают дистиллированную воду и при помощи корректора устанавливают шкалу гальванометра на "нуль".

I6.6.5. В распылитель подают рабочие стандартные растворы натрия, каждый не менее 2-х раз и записывают показания прибора.

I6.6.6. Капилляр промывают дистиллированной водой и в пламя горелки подают исследуемые пробы также не менее 2-х раз. Показания прибора заносят в журнал исследований.

I6.6.7. Через каждые 5-6 проб распылитель промывают дистиллированной водой до тех пор, пока шкала гальванометра не установится на "нуль" и подают в распылитель рабочие

стандартные растворы натрия, в пределах которых укладываются показания исследуемых проб.

I6.6.8. Ход исследования проб плазмы крови на содержание калия проводят аналогично натрию, но используются рабочие растворы калия и светофильтр на калий.

I6.6.9. В конце исследования капилляр распылителя промывается дистиллированной водой, отключается газ, а затем воздух, выключается прибор из электросети, закрываются диафрагма и фотоэлемент и снимаются светофильтры.

I6.7. Расчеты результатов

Содержание калия и натрия в плазме крови расчитывают по калибровочным кривым, построенным на основании измерений рабочих стандартных растворов с учетом степени разведения для калия - I:20, для натрия - I:I50.

I6.8. Ошибка метода

Ошибка метода при соблюдении режима работы прибора и показаний стандартных растворов составляет ≤ 2 %.

I6.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение дня один исследователь производит I50 анализов.

I6.I0. Физиологические пределы

I6.I0.I. Изменение уровня натрия и калия в крови приводит к нарушению кислотно-щелочного равновесия в организме животных.

I6.I0.2. Снижение натрия в плазме крови (гипонатриемия) отмечают при длительном солевом голодании, что может привести к нарушениям обмена веществ типа ацидоза кетоза, остеодистрофии.

I6.I0.3. Повышение калия в плазме крови (гиперкалиемия) устанавливают при поедании большого количества свежей молодой травы в первые недели после выгона на пастбище, при пастбищной тетании.

I6.I0.4. Большое поступление калия с кормом может выводить натрий из организма.

I6.II. Источники литературы

I6.II.I. Бриккер В.Н. Лабораторное дело, I96I, 7, 3.

I6.II.2. Вержиковская В.Г., Попов В.В. Лабораторное дело, I963, 6, 2I-24.

I6.II.3. Инструкция к пламенному фотометру.

I7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ГИДРОЛИЗУ БЕТА-ГЛИЦЕРОФОСФАТА

I7.I. Принцип метода

Под действием фермента сыворотки крови β-глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора. Активность фермента определяют по количеству освободившегося неорганического фосфора.

I7.2. Реактивы

I7.2.I. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г вещества и растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

I7.2.2. Серная кислота концентрированная, уд. веса I,84.

I7.2.3. Бета-глицерофосфатный субстрат. 2,5 г бета-глицерофосфата натрия и 2,I5 г диэтилбарбитуровой кислоты натриевой соли (мединала) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе на 500 мл до метки. РН 9,0±0,I. Хранят в холодильнике под слоем толуола в течение 7 дней.

I7.2.4. Раствор молибдата аммония. I00 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°С. После охлаждения приливают I00 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают и переносят в мерную колбу на I л, доливают дистиллированной водой до метки.

I7.2.5. Раствор ванадата аммония. 2,5 г растворяют в 500 мл кипящей воды. Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в жёлтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на I л и доливают дистиллированной водой до метки.

I7.2.6. Реактив на фосфор. Готовят путем смешивания растворов молибдата и ванадата аммония в равных объемах. Реактив пригоден в течение I-2 -х месяцев.

I7.2.7. Стандартный раствор фосфора основной. 0,439 г однозамещенного фосфата калия, высушенного над концентрированной серной кислотой, растворяют в I00 мл дистиллированной воды. В I мл раствора содержится I мг фосфора. Из него готовят рабочий стандартный раствор. Берут 5 мл основного раствора и доводят дистиллированной водой в мерной колбе на I00 мл до метки.

I7.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I7.3.I. Трихлоруксусная кислота, ч - 50 г
I7.3.2. Серная кислота, хч, уд.вес I,84 - I5 мл
I7.3.3. Бета-глицефосфат натрия. ч - I,25 г (динатрий 2-глицерофосфат)
I7.3.4. Диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), ч - I,I0 г
I7.3.5. Аммоний молибденовокислый, чда - I5 г
I7.3.6. Аммоний ванадиевокислый , чда - 0,4 г
I7.3.7. Калий фосфорнокислый однозамещенный, хч - 0,5 г.

I7.4. Специальное оборудование и аппаратура

I7.4.I. Фотоэлектрометр.
I7.4.2. Термостат.
I7.4.3. Холодильник.
I7.4.4. Центрифуга.
I7.4.5. Пробирки центрифужные.
I7.4.6. Колбы мерные на I00 и 500 мл.
I7.4.7. Эксикатор.
I7.4.8. Электроплитка.
I7.4.9. Стеклянные палочки.

I7.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

I7.6. Ход определения

I7.6.I. В центрифужные пробирки наливают по 2,5 мл бета-глицерофосфатного субстрата и ставят в термостат при температуре 37°С на I5 мин. На каждую пробу берут по 2 пробирки (№ I и № 2) и на серию исследований по 2 пробирки на контроль (№ 3 и № 4) и по 2 пробирки на стандарт (№ 5 и № 6).

I7.6.2. Через I5 минут в пробирку № I добавляют 0,5 мл сыворотки и продолжают нагревать все пробирки в термостате при 37°С в течение 60 мин (точно!).

I7.6.3. Пробы охлаждают, а затем вносят: в пробирку № 2 0,5 мл сыворотки, №3 и № 4 по 0,5 мл дистиллированной воды, № 5 и № 6 - по 0,5 мл рабочего стандартного раствора фосфора.

I7.6.4. Во все пробирки приливают по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 20 мин при I500 об/мин.

17.6.5. Берут 2,5 мл надосадочной жидкости , добавляют 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают стеклянной палочкой и дают стоять 2 часа.

17.6.6. Центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин.

17.6.7. Фотометрируют пробы и стандарт при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной слоя 1 см против контроля.

17.7. Расчеты результатов

Расчеты проводят по формулам:

$$X_1 = \frac{A_1}{B} \times 5 \qquad X_2 = \frac{A_2}{B} \times 5 \qquad X_1 - X_2 = \text{АЩФ}, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность исследуемой пробы после инкубации;

A_2 – оптическая плотность исследуемой пробы до инкубации;

B – оптическая плотность рабочего стандартного раствора фосфора;

5 – коэффициент (для 5 мг%-ного стандартного раствора фосфора);

X_1 – количество мг неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки после инкубации ее с глицерофосфатным субстратом;

X_2 – количество мг неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки до инкубации с глицерофосфатным субстратом.

Разница в содержании неорганического фосфора до и после инкубации условно обозначается единицами Боданского.

17.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5 $\pm$ 1%.

17.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение дня один лаборант проводит анализы в 30 образцах сыворотки крови.

17.10. Физиологические пределы

17.10.1. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови здоровых животных представлена в таблице 4.

17.10.2. Активность щелочной фосфатазы повышается при нарушении фосфорного и кальциевого обменов, при остеодистрофии.

17.II. Источники литературы

17.II.1. Bodansky A.J. Biol. chem., 1933, 101, 93.

17.II.2. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. М., 1973, 88-90.

17.II.2. Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л.А. Ветеринария, 1972, 10, 119.

18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО РЕЗЕРВА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДИФФУЗИОННЫМ МЕТОДОМ

18.1. Принцип метода

В одной половине сдвоенной колбы плазма крови обрабатывается серной кислотой, благодаря чему выделяется углекислый газ, находящийся в составе бикарбонатов. Выделившийся углекислый газ поглощается раствором едкого натра, который находится в другой половине колбы. Избыток едкого натра, не вступившего в реакцию с углекислым газом, и половину натрия углекислого (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2, оттитровывают раствором серной кислоты. По количеству связанного едкого натра определяют количество выделенного из плазмы углекислого газа, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов ($NaHCO_3$).

18.2. Реактивы

18.2.1. 0,1 н раствор серной кислоты (из фиксанала).

18.2.2. 0,2 н раствор серной кислоты. Готовится из 0,1 н раствора серной кислоты в день исследования.

18.2.3. 0,1 н раствор едкого натра.

18.2.4. 0,02 н раствор едкого натра в бутыли, защищенной от доступа воздуха и соединенной с микробюреткой на 5 мл

18.2.5. 5%-ный раствор серной кислоты. Берут 2,7 мл концентрированной серной кислоты и добавляют 95 мл дистиллированной воды.

18.2.6. 1%-ный спиртовый раствор фенолфталеина .

18.2.7. Вазелиновое масло.

18.2.8. 1%-ный раствор гепарина.

I8.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I8.3.I. Серная кислота, фиксанал - I шт.
I8.3.2. Натр едкий, хч - 4 г.
I8.3.3. Серная кислота концентрированная, хч - 3 мл.
I8.3.4. Фенолфталеин - 0,3 г.
I8.3.5. Вазелиновое масло - I00 мл.
I8.3.6. Гепарин - 0,3 г.

I8.4. Специальное оборудование и аппаратура

I8.4.I. Сдвоенные колбы с резиновыми пробками.
I8.4.2. Микробюретки на 2 и 5 мл.
I8.4.3. Штативы универсальные.
I8.4.4. Пипетки на I, 2, 5 мл.
I8.4.5. Бутыль с тубусом.
I8.4.6. Центрифужные пробирки из толстого стекла.
I8.4.7. Центрифуга.
I8.4.8. Колбы мерные на I00 и I000 мл.

I8.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма крови, полученная в условиях, максимально исключающих доступ воздуха в пробу.

I8.6. Ход определения

I8.6.I. В чистые, сухие центрифужные пробирки вносят 0,5-I,0 мл вазелинового масла, 2-3 капли I%-ного раствора гепарина и закрывают пробками, нумеруют.

I8.6.2. В подготовленную пробирку берут кровь, осторожно перемешивают и ставят в прохладное место (термос со льдом).

I8.6.3. В лаборатории кровь центрифугируют в той же пробирке под слоем вазелинового масла (пробирки открывают) при 2500-3000 об/мин в течение 20 минут.

I8.6.4. Плазму крови вместе с вазелиновым маслом переносят в другую пробирку и хранят в холодильнике.

I8.6.5. В одну половину сдвоенной колбы наливают 2 мл 0,02 н раствора едкого натра, закрывают пробкой, в другую половину колбы - 0,5 мл плазмы крови и I мл 5%-ного раствора серной кислоты и быстро закрывают ее пробкой. Анализы проводят серийно. Сначала во все колбы вносят из бюреток на 5 мл раствор едкого натра, затем вносят плазму и раствор серной кислоты, каждый раз поочередно открывая их.

18.6.6. Проверяют хорошо ли закрыты колбы, осторожно перемешивают (вращательными движениями) плазму крови с кислотой и оставляют стоять в течение 4-х часов (можно и больше, обычно на ночь). В контроле (не менее 4-х колб) вместо плазмы вносят дистиллированную воду. Перемешивание плазмы с кислотой проводят не менее 3-х раз.

18.6.7. Через четыре часа (или утром следующего дня) приступают к титрованию. Для этого поочередно открывают половину колб, где находится раствор едкого натра, вносят 2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки на 2 мл. 0,02 н раствором серной кислоты до полного обесцвечивания раствора.

18.7. Расчеты результатов

18.7.1. По разнице титрования в контрольных и опытных образцах устанавливают количество мл 0,02 н раствора едкого натра, связанного с углекислым газом, вытесненным из бикарбонатов плазмы.

18.7.2. Расчет ведут по формуле:

$$X \text{ об.}\%CO_2 = \frac{(V_к - V_п) \cdot 0{,}448}{V_{пл}} \cdot 100, \text{ где}$$

$V_к$ – количество 0,02 н раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование контрольного образца;

$V_п$ – количество 0,02 н раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование исследуемого образца;

$V_к - V_п$ – количество 0,02 н раствора едкого натра в мл, связанного с CO_2;

$V_{пл}$ – количество плазмы крови в мл (в методике принято равным 0,5 мл);

0,448 – коэффициент пересчета 0,02 н раствора едкого натра на CO_2 в условиях данной реакции;

100 – коэффициент для перевода результатов анализа на 100 мл плазмы крови.

18.7.3. Разницу количества (мл) 0,02 н раствора серной кислоты, пошедшего на титрование контрольного и опытного образца, умножают на коэффициент 89,6 и получают конечный результат в об.%CO_2.

18.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 3±1%.

18.9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 100 анализов.

18.10. Физиологические пределы

Нормальные величины щелочного резерва в плазме крови животных представлены в таблице 2.

18.11. Источники литературы

18.11.1. Кондрахин И.П. Труды Московской ветеринарной академии, 1963,47, 111-118.

18.11.2. Петров П.Е. Ветеринария, 1974. I, 89-92.

18.11.3. Кондрахин И.П., Петров П.Е. Методика определения резервной щелочности крови сельскохозяйственных животных с помощью лабораторного титратора Т-110. Утверждена ГУВ МСХ СССР 16.02.76 г.

19. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

19.1. Принцип метода

Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из плазмы крови при помощи малолетучих растворителей и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина.

19.2. Реактивы

19.2.1. 96%-ный этиловый спирт.

19.2.2. 11 н раствор едкого калия: 617,21 г едкого калия доводят дистиллированной водой в колбе на 1 л.

19.2.3. 1 н раствор едкого калия в 96%-ном этиловом спирте. К 1 объему 11 н раствора едкого калия добавить 10 объемов этилового спирта. Раствор готовят в день проведения анализов.

I9.2.4. Ксилоло-октановая смесь (I:I). Готовят в день проведения анализов.

I9.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

I9.3.I. Ксилол, ч. - I50 мл.
I9.3.2. Октан, х.ч. - I50 мл.
I9.3.3. Спирт этиловый 96%-ный - I00 мл.
I9.3.4. Калий едкий - 75 г.

I9.4. Специальное оборудование и аппаратура

I9.4.I. Спектрофотометр типа СФ-I6, СФ-4 и др.
I9.4.2. Пробирки из стекла пирекс с шлифованными пробками.
I9.4.3. Центрифужные пробирки.
I9.4.4. Пипетки градуированные на I, 5, I0 мл.
I9.4.5. Водяная баня.
I9.4.6. Ультрафиолетовая лампа ПРК-4.
I9.4.7. Вентилятор настольный.
I9.4.8. Центрифуга.
I9.4.9. Мерные цилиндры на 250 мл.
I9.4.I0. Стеклянные палочки.

I9.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма крови.

I9.6. Ход определения

I9.6.I. В центрифужную пробирку набирают I мл плазмы крови и добавляют такое же количество I н спиртового раствора едкого калия.

I9.6.2. Перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза на водяную баню при температуре 60°С на 20 минут.

I9.6.3. Пробу охлаждают в воде со льдом в течение 5-I0 минут и добавляют 3 мл ксилоло-октановой смеси.

I9.6.4. Пробирку со смесью сильно встряхивают и дают постоять, после чего центрифугируют 5 минут при I500 об/мин.

I9.6.5. Надосадочную жидкость переносят пипеткой в кварцевую кювету и фотометрируют при длине волны 460 нм (определяют оптическую плотность каротина) с использованием лампы накаливания.

I9.6.6. Для определения витамина А пробы фотометрируют при длине волны 328 нм до и после облучения их ультрафиолетовыми лучами с использованием дейтериевой лампы и свето-

фильтра УФС-2 и вычисляют разницу оптической плотности

19.6.7. Пробы облучают в закрытых пробирках из стекла пирекс лампой ПРК-4 на расстоянии 15-19 см в течение часа. Охлаждают с помощью настольного вентилятора.

19.7. Расчеты результатов

Витамин А, мкг% = 637 . E_I.3

Каротин, мкг% = 480.E_2.3 ; где

480 и 637 - постоянные коэффициенты;

E_I- разница оптической плотности пробы до и после облучения при 328 нм;

E_2- оптическая плотность пробы при 460 нм;

3 - количество мл ксилоло-октановой смеси.

19.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5±1%.

19.9. Время, необходимое для проведения исследования

При серийных исследованиях один человек выполняет 25 анализов.

19.10. Физиологические пределы

19.10.1. Содержание каротина в сыворотке крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловный период. Уровень каротина в сыворотке крови свидетельствует о величине поступления его в организм с кормами. Усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов в организме.

19.10.2. Уровень витамина А и каротина снижается при хранении плазмы, что следует учесть при проведении анализов.

19.11. Источники литературы

19.11.1. Покровский А.А. Методы биохимических исследований в клинике. М., 1969, 463-468.

20. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ПЛАЗМЕ КРОВИ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

20.1. Принцип метода

Витамин А взаимодействует с треххлористой сурьмой с образованием соединения синего цвета, интенсивность которого зависит от концентрации витамина.

20.2. Реактивы

20.2.I. Хлороформ очищенный, обезвоженный. Химически чистый хлороформ промывают 2-3 раза дистиллированной водой, обезвоживают сернокислым натрием (безводным), пропускают через стеклянный перегонный аппарат на шлифах и хранят во флаконах из желтого стекла.

20.2.2. Насыщенный раствор треххлористой сурьмы. Вещество промывают небольшим количеством очищенного хлороформа, пока не будет стекать бесцветный раствор. Высушивают в эксикаторе над серной кислотой в течение 48 часов. Готовят насыщенный раствор (2I-23%-ный) при температуре 20°С на обезвоженном хлороформе.

20.2.3. Спирт этиловый 96%-ный.

20.2.4. Эфир серный для наркоза.

20.2.5. 60%-ный водный раствор едкого калия. Берут 600 г едкого калия (хч, чда) и растворяют в 400 мл дистиллированной воды.

20.2.6. Уксусный ангидрид, ч.

20.2.7. I%-ный спиртовый раствор фенолфталеина.

20.2.8. Серная кислота концентрированная (уд. вес I,84), хч.

20.2.9. Баллон с углекислотой.

20.2.I0. Натрий сернокислый безводный.

20.2.II. Медь сернокислая, хч, чда.

20.2.I2. Кобальт азотнокислый, чда.

20.2.I3. Стандартный раствор основной. Берут 7,5 г сернокислой меди, высушенной в сушильном шкафу при температуре I05°С до постоянного веса и 0,35 г азотнокислого кобальта, высушенного в течение 48 час в эксикаторе над серной кислотой и растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

20.2.I4. Рабочие стандартные растворы для пробирок-эталонов.

№	Количество основного раствора, мл	Количество дистиллиров. воды, мл	Общий объем, мл	Число синих единиц
I	-	I0,0	I0	0
2	0,73	9,27	I0	0,75
3	0,97	9,03	I0	I,00
4	I,2I	8,79	I0	I,25
5	I,46	8,54	I0	I,50
6	I,70	8,30	I0	I,75
7	I,94	3,06	I0	2,00
8	2,42	7,58	I0	2,50
9	2,9I	7,09	I0	3,00
I0	3,40	6,60	I0	3,50
II	3,88	6,I2	I0	4,00
I2	4,37	5,63	I0	4,50
I3	4,85	5,I5	I0	5,00

Рабочие стандартные растворы хранят в пробирках, закрытых корковыми пробками. Пробки сверху заливают расплавленным парафином. Срок хранения 2 мес в темном месте и в чехле из темной бумаги.

20.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

20.3.1. Хлороформ, хч - 500 мл.
20.3.2. Сурьма треххлористая, хч, - 50 г.
20.3.3. Серная кислота концентрированная - 1 кг.
20.3.4. Калий едкий, хч - 0,6 кг.
20.3.5. Уксусный ангидрид, ч - 10 мл.
20.3.6. Этиловый спирт 96%-ный - 1,75 л.
20.3.7. Натрий сернокислый, безводный, хч, чда - 2 кг.
20.3.8. Фенолфталеин - 1 г.
20.3.9. Эфир серный для наркоза - 15 л.

20.4. Специальное оборудование и аппаратура

20.4.1. Бюретка с притертым краном на 10-15 мл для треххлористой сурьмы.
20.4.2. Водяная баня.
20.4.3. Пробирки центрифужные.
20.4.4. Пробирки химические.
20.4.5. Воздушные холодильники - стеклянные трубки.
20.4.6. Пипетки измерительные на 1,2,5, 10 мл.
20.4.7. Сушильный шкаф.
20.4.8. Перегонный аппарат стеклянный на шлифах.
20.4.9. Весы аналитические.
20.4.10. Флаконы из желтого стекла.
20.4.11. Эксикаторы.
20.4.12. Колбы конические.
20.4.13. Колбы мерные.
20.4.14. Холодильник бытовой.
20.4.15. Делительные воронки.
20.4.16. Колбы Вюрца.
20.4.17. Воронки для фильтрования.

20.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма крови.

20.6. Ход определения

20.6.1. В коническую колбу объемом 100 мл вносят 10 мл плазмы крови, 10 мл 60%-ного раствора едкого калия и 10 мл 96%-ного этилового спирта.

20.6.2. Содержимое колбы тщательно перемешивают, закрывают резиновой пробкой с воздушным холодильником (стеклянная трубка длиной 60 см, диаметром 1,2 см) и ставят для гидролиза в воздушную баню при температуре 60°С на 30 мин. Колбу периодически встряхивают.

20.6.3. Колбу со смесью охлаждают под струей водопроводной воды или в воде со льдом.

20.6.4. Содержимое колбы переносят в делительную воронку.

20.6.5. Колбу ополаскивают сначала небольшим количеством (1-2 мл) дистиллированной воды, а затем 2-3 раза серным эфиром. Общий объем эфира 50-60 мл. Воду и эфир сливают в ту же делительную воронку.

20.6.6. Делительную воронку закрывают пробкой и содержимое хорошо перемешивают, время от времени приоткрывая кран.

20.6.7. После четкого расслоения нижнюю (темную) жидкость сливают в другую делительную воронку, добавляют 30-40 мл серного эфира и повторяют п. 20.6.6.

20.6.8. После расслоения верхний (эфирный) слой отсасывают и переносят в первую делительную воронку, где находится эфирный экстракт.

20.6.9. Экстрагирование производят третий раз (п.20.6.7., 20.6.8).

20.6.10. Объединенные эфирные вытяжки в делительной воронке промывают дистиллированной водой. Для этого в делительную воронку с эфирной вытяжкой вносят 70-80 мл дистиллированной воды, закрывают пробкой и ставят в штатив. После расслоения воду сливают. Процедуру повторяют 4-5 раз, пока в промывной воде при добавлении 2-3 капель 1%-ного раствора фенолфталеина не будет появляться розовая окраска.

20.6.11. Если жидкости при экстрагировании и промывании разделяются плохо, то добавляют по 10 мл 96%-ного этилового спирта.

20.6.12. Промытый эфирный экстракт высушивают путем фильтрования его через безводный сернокислый натрий в сухую чистую колбу со складчатым фильтром, а оставшиеся на фильтре сернокислый натрий промывают небольшим количеством эфира, который присоединяют к основному экстракту.

20.6.13. Эфирный экстракт из колбы отгоняют в водяной бане при температуре 60 °С в токе углекислоты до получения сухого остатка.

20.6.14. Сухой остаток растворяют в 1 мл хлороформа.

20.6.15. Пробу переносят в маленькую пробирку, закрывают резиновой пробкой, обернутой алюминиевой фольгой.

20.6.16. На анализ берут 0,2 мл, добавляют 1 каплю уксусного ангидрида и 2 мл насыщенного раствора трехлористой сурьмы и сравнивают интенсивность синей окраски со шкалой стандартных растворов. Отсчет производят сразу (не позднее 10 сек), так как окраска быстро исчезает.

20.7. Расчеты результатов

20.7.1. Количество витамина А в плазме крови определяют по формуле:

$$\text{Вит. А, мкг} = \frac{n \cdot V \cdot 1000}{в \cdot 4}, \text{ где}$$

n - число синих единиц, установленных по шкале стандартов;
V - объем хлороформа, взятого для растворения сухого остатка, мл;
в - количество плазмы крови, взятого для анализа, мл;
4 - постоянный коэффициент;
1000 - коэффициент пересчета в мкг%.

20.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±5%.

20.9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 30 анализов.

20.10. Физиологические пределы

Содержание витамина А в сыворотке крови представлено в таблице 2.

20.11. Источники литературы

20.11.1. Лабораторные исследования в ветеринарии. Под ред. В.Я. Антонова и П.Н. Блинова. М., 1971, 441-445.

20.11.2. Бессарабова Р.Ф., Емелина Н.Т., Петухова Е.А. Методы зоотехнического анализа кормов. М., ВАСХНИЛ, 1976.

21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

21.1. Принцип метода

Каротин извлекается из безбелкового фильтрата плазмы крови петролейным эфиром или авиационным бензином и определяется колориметрически.

21.2. Реактивы

21.2.1. Петролинейный эфир или авиационный бензин марки Б-70.

21.2.2. 96%-ный этиловый спирт.

21.2.3. Основной стандартный раствор. 360 мг хромовокислого калия растворяют в мерной колбе на 500 мл небольшим количеством дистиллированной воды и затем доводят до метки.

21.2.4. Рабочий стандартный раствор готовят в день анализа путем разведения основного стандартного раствора I:I.

21.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

21.3.1. Петролейный эфир (ч) или авиационный бензин марки Б-70 - 600 мл.

21.3.2. 96%-ный этиловый спирт - 300 мл.

21.3.3. Калий хромовокислый, х.ч. - 360 мг.

21.4. Специальное оборудование и аппаратура

21.4.1. Фотоэлектроколориметр.

21.4.2. Химические пробирки.

21.4.3. Пипетки на I, 5, 10 мл.

21.4.4. Мерные колбы на 250 и 500 мл.

21.4.5. Стеклянные палочки.

21.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма крови.

21.6. Ход определения

21.6.1. В пробирку вносят I мл плазмы крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

21.6.2. Добавляют 6 мл петролейного эфира или авиационного бензина, встряхивают в течение 2 минут.

21.6.3. Приливают осторожно по стенкам 0,5 мл дистиллированной воды и оставляют стоять до четкого разделения и просветления верхнего слоя.

21.6.4. Верхний слой осторожно сливают в пробирку и колориметрируют на ФЭКе при синем светофильтре в кювете с толщиной слоя I см против контроля (дистиллированная вода, спирт, эфир или бензин).

21.6.5. Параллельно колориметрируют рабочий стандартный раствор, обработанный также, как и основные пробы.

21.7. Расчеты результатов

Расчет проводят по формуле:

$$X = \frac{E_{пр}}{E_{ст}} \cdot 1{,}248 \text{ , где}$$

X - количество каротина в мг%;

$E_{пр}$ - оптическая плотность исследуемого образца;

$E_{ст}$ - оптическая плотность стандартного раствора;

1,248 - коэффициент пересчета в мг%.

21.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5±1%.

21.9. Время, необходимое для проведения исследования

Время на одно исследование 20-25 минут. В течение рабочего дня в среднем 30 проб.

21.10. Физиологические пределы

Содержание каротина в плазме крови повышается в летний период и снижается в зимне-стойловый период. Уровень каротина в плазме крови свидетельствует о величине его поступления в организм с кормами. Усвоение его и превращение в витамин А зависит от интенсивности обменных процессов в организме. Содержание каротина в плазме крови здоровых животных представлено в таблице I.

21.11. Источники литературы

21.11.1. Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л.А.- Экспресс метод определения каротина в плазме крови. Ветеринария, 1973, 2, с. 108.

22. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ПЛАЗМЕ КРОВИ

22.1. Принцип метода

Аскорбиновая кислота восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с $\alpha\alpha'$-дипиридилом комплексное соединение розового цвета.

22.2. Реактивы

22.2.1. 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды.

22.2.2. 40%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды.

22.2.3. 3%-ный раствор хлорного железа. Хранится не более 3 суток. 1,5 г хлорного железа растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

22.2.4. 1%-ный раствор $\alpha\alpha'$-дипиридила. В воде $\alpha\alpha'$-дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г $\alpha\alpha'$-дипиридила прилить 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл долить бидистиллированной воды до метки.

22.2.5. 85%-ная фосфорная кислота ортo.

22.2.6. Аскорбиновая кислота.

22.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

22.3.1. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), ч.-50 г.

22.3.2. Фосфорная кислота орто, х.ч. - 10 мл.

22.3.3. Железо хлорное (железо трехлористое), ч.д.а., х.ч.-3 г.

22.3.4. $\alpha\alpha'$-дипиридил (2,2-дипиридил), ч. - 1 г.

22.3.5. Аскорбиновая кислота - 35 мг.

22.4. Специальное оборудование и аппаратура

22.4.1. Фотоэлектроколориметр.

22.4.2. Центрифуга.

22.4.3. Центрифужные пробирки.

22.4.4. Колбы мерные на 50 и 100 мл.

22.4.5. Пипетки градуированные на 0,1, 1 и 2 мл.

22.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит плазма крови.

22.6. Ход определения

22.6.1. К 2 мл плазмы добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 минут на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков.

22.6.2. Центрифугируют 20 минут при 2000 об/мин.

22.6.3. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha\alpha'$-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски. Окраска стабильна в течение суток.

22.6.4. По истечении 30 минут пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду , а затем поступают также, как с опытными пробами).

22.7. Расчеты результатов

22.7.1. Расчет содержания витамина С производят с помощью калибровочного графика. 33,3 мг аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ным раствором трихлоруксусной кислоты.

22.7.2. В 6 мерных колбочек на 100 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20, 30 мл стандартного раствора и доводят до метки дистиллированной водой.

22.7.3. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто) , 0,8 мл 1%-ного раствора $\alpha\alpha'$-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа, перемешивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски.

22.7.4. Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

22.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 3 ±1%.

22.9. Время, необходимое на проведение исследования

В течение дня один исследователь проводит 50 анализов.

22.10. Физиологические пределы

Содержание витамина С в плазме здоровых животных представлено в таблице 2.

22.11. Примечание:

22.11.1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед исследованием. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении в холодильнике снижается.

22.11.2. Содержание витамина С в сыворотке крови значительно ниже, чем в плазме.

22.11.3. Определение содержания витамина С необходимо проводить в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4-х часов после отбора проб крови.

22.12. Источники литературы

22.12.1. Lannoni V., Lynch M., Goldstein S., Sato P. A rapid micromethod for the determination of ascorbic acid in plasma and tissues. Biochem. Med., 1974, 11, 1, 41-48.

22.12.2. Петрова А.Т., Абрамова Т.К. К методике определения витамина С. Ветеринария, 1979, 2, 74-75.

23. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЙОДА, СВЯЗАННОГО С БЕЛКОМ, В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО АКЛАНДУ В МОДИФИКАЦИИ С.В.СИЛАЕВОЙ

23.1. Принцип метода

Йод в присутствии церий-арсенита образует окрашенное соединение, определяемое колориметрически.

23.2. Реактивы

23.2.1. 10%-ный раствор сернокислого цинка. Берут 10 г вещества и растворяют в 90 мл бидистиллированной воды.

23.2.2. 0,5 н раствор едкого натра. 20 г едкого натра вносят в мерную колбу на 1 л и доливают бидистиллированной

водой до метки.

23.2.3. 4 н раствор углекислого натрия. Берут 21,2 г углекислого натрия безводного и доводят в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой до метки.

23.2.4. 2 н раствор соляной кислоты. Фиксанал соляной кислоты растворяют бидистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл или 82 мл концентрированной соляной кислоты с удельным весом 1,19 доводят бидистиллированной водой до 500 мл.

23.2.5. 10%-ный раствор серной кислоты. К 94,5 мл дистиллированной воды приливают 5,5 мл концентрированной серной кислоты с удельным весом 1,84.

23.2.6. Раствор мышьяковистого ангидрида. 3,8 г мышьяковистого ангидрида растворяют в 50 мл 1 н раствора едкого натра, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и доводят объем до 500 мл 3,5 н раствором серной кислоты. Ядовит. Хранят в темном месте в эксикаторе.

23.2.7. 3,5 н раствор серной кислоты. 97,7 мл концентрированной серной кислоты (уд. вес 1,84) доводят до 1 л бидистиллированной водой.

23.2.8. Стандартный раствор йода. Раствор А готовят из фиксанала йодистого калия. В 1 мл 0,1 н раствора йодистого калия содержится 12,68 мг йода. Раствор В: 2 мл раствора А доводят бидистиллированной водой до 1 литра. В 1 мл содержится 25,38 мкг йода. Раствор С: 4 мл раствора В доводят бидистиллированной водой до 500 мл. В 1 мл содержится 0,202 мкг йода. Раствор Д: 10 мл раствора доводят бидистиллированной водой до 100 мл. В 1 мл содержится 0,02 мкг йода.

23.2.9. Раствор сульфата церия. Берут 39 г церийаммонийсульфата и растворяют в 1 л 3,5 н раствора серной кислоты.

23.2.10.1 н раствор едкого натра. 40 г едкого натра в мерной колбе доводят бидистиллированной водой до 1 литра.

23.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

23.3.1. Цинк сернокислый - 10 г

23.3.2. Натр едкий - 3 г

23.3.3. Натрий углекислый - 22 г

23.3.4. Соляная кислота концентрированная (уд.вес 1,19) - 20 мл

23.3.5. Мышьяковистый ангидрид - 0,4 г

23.3.6. Серная кислота концентрированная (уд. вес 1,84) - 30 мл
23.3.7. Церий аммонийсульфат - 2 г

23.4. Специальное оборудование и аппаратура

23.4.1. Фотоэлектроколориметр.
23.4.2. Кварцевые пробирки центрифужные.
23.4.3. Цилиндры мерные на 100 мл.
23.4.4. Колбы мерные на 100, 500 и 1000 мл.
23.4.5. Центрифуга.
23.4.6. Пипетки измерительные на 1 и 10 мл.
23.4.7. Стеклянные палочки.
23.4.8. Ультратермостат или водяная баня, поддерживающая температуру 37°С.
23.4.9. Секундомер.
23.4.10. Пробирки химические.
23.4.11. Штативы для пробирок.
23.4.12. Сушильный шкаф.
23.4.13. Муфельная печь.

23.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

23.6. Ход определения

23.6.1. В кварцевую центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 7 мл бидистиллированной воды, 1 мл 10%-ного раствора сернокислого цинка и 1 мл 0,5 н раствора едкого натра. После внесения каждого реактива тщательно перемешивают стеклянной палочкой.
23.6.2. Через 30 мин центрифугируют в течение 20 мин при 1500 об./мин.
23.6.3. Надосадочную жидкость осторожно сливают.
23.6.4. Осадок промывают 10 мл дистиллированной воды с последующим центрифугированием и удалением жидкости. Промывание проводят 3 раза.
23.6.5. К осадку добавляют 1 мл 4 н раствора углекислого натрия, перемешивают стеклянной палочкой.
23.6.6. Осадок высушивают в сушильном шкафу при температуре 100°С в течение 10-12 часов, а затем сжигают в муфельной печи при температуре 400-450°С.

23.6.7. Пробирки охлаждают, к золе добавляют I мл 2 н раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Перемешивают стеклянной палочкой тщательно в течение 20-30 мин.

23.6.8. Центрифугируют при 3000 об/мин в течение I0 мин.

23.6.9. В опытную пробирку вносят 3 мл центрифугата, I мл бидистиллированной воды, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и I мл 3,5 н раствора серной кислоты.

23.6.I0. В контрольную пробирку вносят 3,5 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 2 н раствора соляной кислоты, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и I мл 3,5 н раствора серной кислоты (вливают осторожно, обмывая ею стенки пробирки).

23.6.II. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при температуре 37°С.

23.6.I2. Вместе с образцами в термостат помещают пробирку с раствором сульфата церия.

23.6.I3. Через I0 мин в каждую пробирку (не вынимая из термостата) с интервалом в I мин (по секундомеру) вносят 0,5 мл раствора сульфата церия и перемешивают.

23.6.I4. Фотометрируют через I2 мин (точно!) на ФЭКе при синем светофильтре (434 нм на спектрофотометре) в кювете с толщиной слоя I см против контроля, поочередно вынимая пробирки из термостата с интервалом в I мин.

23.7. Расчеты результатов

23.7.I. Расчет результатов производят по калибровочному графику.

23.7.2. В 4 пробирки (№I, №2, №3, №4) вносят по 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты. В пробирку №I добавляют 3,5 мл бидистиллированной воды, №2 – 2,5 мл бидистиллированной воды и I мл стандартного раствора Д (0,02 мкг йода), №3 – I,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл раствора Д (0,04 мкг йода), №4 – 0,5 мл бидистиллированной воды и 3 мл раствора Д (0,06 мкг йода).

23.7.3. Во все пробирки вносят по 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и по I мл 3,5 н раствора серной кислоты и затем производят все операции как и с образцами (п.23.6.9. – 23.6.I3.).

23.7.4. Калибровочный график строят на полулогарифмической бумаге. Экстинции откладывают в логарифмическом, а количество йода - в миллиметровом масштабах. Найденное по графику количество йода в мкг умножают на коэффициент 200, чтобы получить мкг%.

23.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5±1%.

23.9. Время, необходимое на проведение исследования

В течение дня один исследователь проводит 20 анализов.

23.10. Физиологические пределы

Содержание йода, связанного с белком, в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2.

23.11. Примечание

23.11.1. В комнате, где проводят анализы, не должно быть следов йода.

23.11.2. Посуда и пробирки должны быть тщательно вымыты.

23.11.3. Все реактивы должны быть химически чистыми.

23.11.4. Используют только бидистиллированную воду, полученную с помощью стеклянного (на шлифах) перегонного аппарата.

23.12. Источники литературы

23.12.1. Acland I. D. The estimation of serum protein-bound iodine by alualine incineration. Biochem. J., 1957, 66, 177.

23.12.2. Силаева С.В., Самохин В.Т., Башкеев Е.Д., Фомичев Ю.П. Ветеринария, 1970, 6, 97-98.

23.12.3. Методические рекомендации по химическим и биохимическим исследованиям в зоотехнии. Дубровицы, 1975, стр. 78-81.

24. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С СУЛЬФОФОСФОВАНИЛИНОВЫМ РЕАКТИВОМ

24.1. Принцип метода

Продукты распада ненасыщенных липидов образуют с реактивом, состоящим из серной, орто-фосфорной кислот и ванилина, окрашенное соединение. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

24.2. Реактивы

24.2.1. Серная кислота, концентрированная для пробы Саваля.

24.2.2. Фосфорная кислота, орто, 85%-ная.

24.2.3. 0,6%-ный раствор ванилина. 0,6 г ванилина растворяют, нагревая на водяной бане, в небольшом количестве дистиллированной воды. После охлаждения объем доводят до 100 мл. Раствор стабилен при хранении при комнатной температуре.

24.2.4. Фосфорнованилиновая смесь. К 4 частям фосфорной кислоты (орто) добавляют 1 часть 0,6%-ного раствора ванилина. Хранят в посуде из темного стекла при комнатной температуре. Готовят перед проведением анализов.

24.2.5. Хлороформ для наркоза, хч.

24.2.6. Стандартный раствор триолеина. Взвешивают на аналитических весах 500 мг триолеина, вносят в мерную колбу на 100 мл и до метки доливают хлороформа. Тщательно перемешивают. Хранят в холодильнике, в посуде из тёмного стекла с притертой пробкой.

24.2.7. Спирт этиловый абсолютный.

24.2.8. Спирт метиловый.

24.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

24.3.1. Серная кислота, концентрированная, для пробы Саваля -500мл.

24.3.2. Фосфорная кислота, орто, хч - 500 мл.

24.3.3. Ванилин - 1 г.

24.3.4. Хлороформ для наркоза, хч - 150 мл.

24.3.5. Спирт этиловый абсолютный - 500 мл.

24.3.6. Спирт метиловый - 500 мл.

24.4. Специальное оборудование и аппаратура

24.4.1. Фотоэлектроколориметр.

24.4.2. Водяная баня.

24.4.3. Колбы мерные на 100 мл.
24.4.4. Пипетки измерительные.
24.4.5. Весы аналитические.
24.4.6. Холодильник бытовой.
24.4.7. Флаконы из желтого стекла.
24.4.8. Пробирки химические.

24.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

24.6. Ход определения

24.6.1. В пробирку вносят 0,3 мл сыворотки крови и 5 мл концентрированной серной кислоты. Закрывают резиновой пробкой, обёрнутой алюминиевой фольгой . Тщательно перемешивают.

24.6.2. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, затем охлаждают под струей водопроводной воды до комнатной температуры.

24.6.3. В чистую пробирку вносят 0,4 мл смеси, добавляют 6 мл фосфорновanилиновой смеси, тщательно перемешивают и оставляют на 45 мин в темноте при комнатной температуре.

24.6.4. Фотометрируют на ФЭКе при длине волны, 500-560 нм (зеленый светофильтр № 6) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля (вместо сыворотки берут 0,3 мл дистиллированной воды и обрабатывают так же, как и сыворотку).

24.6.5. Одновременно обрабатывают 0,3 мл стандартного раствора триолеина, как и опытную пробу.

24.7. Расчеты результатов

Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 500 \text{ , где}$$

X - количество общих липидов , мг%;

$E_{оп}$ - экстинция опытной пробы;

$E_{ст}$ - экстинция стандартного образца;

500 - концентрация липидов в стандарте, мг%.

24.8. Примечание

24.8.1. Посуду необходимо мыть отдельно от другой посуды.

24.8.2. Пробирки и пипетки перед использованием прополаскивают дистиллированной водой, а затем этиловым и метиловым спиртом.

24.8.3. Сыворотку крови можно хранить в холодильнике в течение 5 дней.

24.9. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±5%.

24.10. Время, необходимое для проведения исследования

В течение рабочего дня один исследователь проводит 30 анализов.

24.11. Физиологические пределы

Содержание общих липидов в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2.

24.12. Источники литературы

24.12.1. Zollner N., Kirsch K. - Z. fur. ges. exp. Med., 1962, 135, 545-561.

24.12.2. Knight I., Anderson S., Rawle I. Clin. Chem., 1972, 18, 3, 199-200.

25. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОБАЛЬТА В КРОВИ ПО МЕТОДУ ГУСЕВА С.И. В МОДИФИКАЦИИ ТИТОВОЙ А.А.

25.1. Принцип метода

Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридилазо)-5-диэтилметаминофенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и измерении оптической плотности среды. Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разлагают 10 н раствором серной кислоты.

25.2. Реактивы

25.2.1. 20%-ный раствор натрия лимоннокислого. 200 г вещества растворяют в 800 мл бидистиллированной воды.

25.2.2. 3 М раствор натрия уксуснокислого. 408 г соли растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л.

25.2.3. 0,3 н раствор соляной кислоты. В мерную колбу на 1 л вносят 24 мл концентрированной соляной кислоты (уд.вес 1,19) и доливают до метки бидистиллированной водой.

25.2.4. 0,05%-ный раствор ПААФ. 50 мг реактива растворяют в 100 мл 96%-ного этилового спирта.

25.2.5. Азотная кислота концентрированная.

25.2.6. 10 н раствор серной кислоты. Берут 266,3 мл серной кислоты (уд.вес 1,84) и доводят до 1 л бидистиллированной водой.

25.2.7. Хлороформ.

25.2.8. Стандартный раствор кобальта основной. 0,4034 г хлористого кобальта ($CoCl_2.6\ H_2O$) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл раствора содержится 100 мкг кобальта.

25.2.9. Рабочий стандартный раствор кобальта. 1 мл основного стандартного раствора разбавляют до 100 мл 0,3 н соляной кислотой. В 1 мл содержится 1 мкг кобальта.

25.2.10. 20%-ный раствор соляной кислоты. Берут 16,8 мл соляной кислоты (уд.вес 1,19) и разводят в 30 мл бидистиллированной воды.

25.3. Количество реактивов, необходимых на 100 анализов

25.3.1. Натрий лимоннокислый трехзамещенный, хч - 50 г.
25.3.2. Натрий уксуснокислый трехводный, хч - 102 г.
25.3.3. Соляная кислота концентрированная (уд.вес 1,19), хч -75 мл
25.3.4. Азотная кислота концентрированная, хч - 500 мл.
25.3.5. Серная кислота (уд.вес 1,84), хч - 270 мл.
25.3.6. Хлороформ, хч - 500 мл.
25.3.7. 2-(2-пиридилазо)-5-диэтилметааминофенол (ПААФ) - 50 мг.
25.3.8. Хлористый кобальт, хч - 200 мг.

25.4. Специальное оборудование и аппаратура

25.4.1. Фотоэлектроколориметр.
25.4.2. Фарфоровые тигли или чашки.
25.4.3. Сушильный шкаф.
25.4.4. Весы аналитические.
25.4.5. Электроплитка.
25.4.6. Муфельная печь.
25.4.7. Водяная баня.
25.4.8. Бюретка на 25 мл.
25.4.9. Пипетки измерительные на 0,2, 1, 5 и 10 мл.

25.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит стабилизированная цельная кровь.

25.6. Ход определения

25.6.1. В фарфоровый тигель или чашку вносят 20 мл цельной крови.
25.6.2. Тигель (чашку) с пробой крови ставят на электроплитку и медленно обугливают. Далее озоляют в муфельной печи в течение 4 часов при температуре 500-550°С.
25.6.3. В теплый тигель приливают 2 мл 50%-ной азотной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая приставшие к ней частички бидистиллированной водой в тигель.
25.6.4. Упаривают досуха на электроплитке или водяной бане, не допуская разбрызгивания содержимого.
25.6.5. Тигель (чашку) ставят в муфельную печь, повышают температуру до 500°С и выдерживают в течение часа. При наличии частичек угля обработку азотной кислотой повторяют.
25.6.6. К золе приливают 2,5 мл 20%-ной соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тигель накрывают часовым стеклом, ставят в водяную баню и кипятят в течение 5 мин.

25.6.7. Содержимое тигля фильтруют в мерную колбу на 25 мл. Тигель обмывают несколько раз бидистиллированной водой и объем доводят до метки.

25.6.8. В делительную воронку или пробирку с притертой пробкой на 45-50 мл вносят 10 мл раствора золы, 2,5 мл 20%-ного раствора лимоннокислого натрия, 2,5 мл 3 М раствора уксуснокислого натрия, 1 мл раствора ПААФ, тщательно перемешивая после прибавления каждого реактива.

25.6.9. Через 10 мин приливают 10 мл 10 н серной кислоты, перемешивают, добавляют 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают в течение 1 мин.

25.6.10. Дают слоям жидкости хорошо разделиться и нижний слой сливают в кювету ФЭКа. При использовании пробирок с притертыми пробками нижний слой отбирают при помощи пипетки с грушей или отсасывают верхний водный слой при помощи водоструйного насоса.

25.6.11. Фотометрируют при 570 нм (фильтр №7) против контроля в кювете с толщиной слоя 1 см.

25.7. Расчеты результатов

25.7.1. Содержание кобальта высчитывают по калибровочному графику.

25.7.2. В делительные воронки или пробирки с притертыми пробками вносят 0,2;0,4;0,8;1,0;1,5 и 2,0 мл рабочего стандартного раствора кобальта. Объем доводят до 10 мл 0,3 н соляной кислотой. Далее поступают как и с образцами. В контроль вместо раствора кобальта вносят 0,3 н соляную кислоту.

25.7.3. По результатам измерений строят калибровочную кривую.

25.7.4. Расчет производят по формуле:

$$\text{Кобальт, мкг\%} = \frac{a \cdot V \cdot 100}{в \cdot c}, \text{ где}$$

а - количество мкг кобальта, найденное по калибровочной кривой;

в - количество крови, мл;

с - количество раствора золы, взятое на анализ, мл;

V - объем раствора золы, мл;

100 - коэффициент для пересчета в мкг%.

25.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 7,6%.

25.9. Время, необходимое на проведение исследования

В течение дня один исследователь проводит 20 анализов.

25.10. Физиологические пределы

Содержание кобальта в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

25.11. Источники литературы

Методические рекомендации по химическим и биохимическим исследованиям в зоотехнии. Дубровицы, 1975, с. 71-74.

26. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРГАНЦА В КРОВИ ПЕРЙОДАТНЫМ МЕТОДОМ

26.1. Принцип метода

Перйодат калия в кислой среде способен окислять марганец до MnO_4^-. Мешающие вещества (восстановители) удаляются или разрушаются в процессе обработки золы.

26.2. Реактивы

26.2.1. 1%-ный раствор перйодата калия. 10 г вещества вносят в химический стакан, добавляют 400 мл бидистиллированной воды и 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Смесь подогревают до растворения перйодата калия, охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л и доводят до метки бидистиллированной водой.

26.2.2. Растворитель. В мерную колбу на 1 л вносят 100 мл концентрированной азотной кислоты, 50 мл 1%-ного раствора перйодата калия и доводят бидистиллированной водой до метки.

26.2.3. Стандартный раствор марганца основной. 0,4388 г перекристаллизованного сернокислого марганца растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл содержится 100 мкг марганца.

26.2.4. Рабочий стандартный раствор марганца. 10 мл основного стандартного раствора доводят до метки в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл содержится 10мкг марганца.

26.2.5. 50%-ный раствор азотной кислоты.

26.2.6. 10%-ный раствор азотной кислоты.

26.2.7. Азотная кислота концентрированная.

26.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

26.3.1. Периодат калия (KJO_4), хч - 1 г.

26.3.2. Фосфорная кислота (орто), хч - 10 мл.

26.3.3. Азотная кислота концентрированная, хч - 800 мл.

26.3.4. Марганец сернокислый, хч - 0,5 г.

26.4. Специальное оборудование и аппаратура

26.4.1. Тигли фарфоровые.

26.4.2. Весы аналитические.

26.4.3. Сушильный шкаф.

26.4.4. Муфельная печь.

26.4.5. Электроплитка.

26.4.6. Мерные колбы на 100 мл и на 1 л.

26.4.7. Фотоэлектроколориметр.

26.4.8. Стеклянные палочки.

26.4.9. Пробирки из термостойкого стекла объемом 35-40 мл.

26.4.10. Пипетки измерительные.

26.4.11. Штативы для пробирок.

26.4.12. Водяная баня.

26.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит цельная кровь.

26.6. Ход определения

26.6.1. В фарфоровый тигель вносят 10 мл крови и медленно обугливают на электроплитке.

26.6.2. Тигель переносят в муфельную печь, доводят температуру до 500-550°С и озоляют в течение 2 часов.

26.6.3. Золу в тигле обрабатывают 2-3 раза 50%-ной азотной кислотой (2-3 мл идет на первую обработку и 1-2 мл - на последующие).

26.6.4. Содержимое тигля выпаривают на электроплитке.

26.6.5. В тигель вносят 10 мл 10%-ной азотной кислоты и снова выпаривают досуха.

26.6.6. В тигель вносят 2 мл концентрированной азотной кислоты, золу растворяют, выпаривают на электроплитке. Далее обработку повторяют, добавляя 1 мл кислоты.

26.6.7. Золу растворяют в 10 мл растворителя при подогревании и помешивании стеклянной палочкой.

26.6.8. Фильтруют в пробирку с меткой на 25 мл. Фильтр предварительно увлажняют бидистиллированной водой. Тигель ополаскивают 5 мл воды и также фильтруют в эту пробирку.

6.9. К фильтрату добавляют 10 мл 1%-ного раствора перйодата калия и кипятят на водяной бане в течение 1 часа.

6.10. Содержимое тигля охлаждают и объем доводят бидистиллированной водой до 25 мл, перемешивают.

6.11. Через 1 час фотометрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете объемом 15 мл против контроля (10 мл растворителя, 5 мл бидистиллированной воды, 10 мл раствора перйодата калия. Смесь кипятят в течение 1 часа).

7. Расчеты результатов

7.1. Содержание марганца вычисляют по калибровочной кривой.

7.2. К 10 мл растворителя вносят 0,5; 1, 2, 3, 4 и 5 мл рабочего стандартного раствора марганца. Объем доводят бидистиллированной водой до 15 мл, прибавляют 10 мл раствора перйодата калия. Пробы кипятят в течение часа. Далее поступают как и с образцами. Содержание марганца в пробах составляет 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мкг.

7.3. Расчет проводят по формуле:

$$\text{Марганец, мкг\%} = \frac{a}{в} \cdot \frac{100}{}, \text{ где}$$

а - количество марганца по калибровочной кривой, мкг;

в - количество крови, мл;

100 - пересчет в мкг%.

8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±6%.

9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 20 анализов.

10. Физиологические пределы

Содержание марганца в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

11. Источники литературы

Аликаев В.А., Петухов Е.А., Халенева Л.Д., Видова Р.Ф. Руководство по контролю качества кормов и полноценности кормления животных. М., 1967, стр. 249-254.

27. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕДИ И ЖЕЛЕЗА В КРОВИ ПО СЕНДЕЛУ В МОДИФИКАЦИИ КУЗНЕЦОВА С.Г.

27.1. Принцип метода

Медь с дифенилкарбазоном при pH 4–5 образует окрашенное соединение.

Железо с о-фенантролином образует оранжевокрасный комплекс.

27.2. Реактивы

27.2.1. 0,5 н раствор соляной кислоты

27.2.2. 2 н раствор соляной кислоты.

27.2.3. 10%-ный раствор аммиака.

27.2.4. 0,1%-ный водный раствор п-нитрофенола.

27.2.5. 1%-ный раствор аскорбиновой кислоты.

27.2.6. 1%-ный раствор солянокислого о-фенантролина. Растворы 27.2.5. и 27.2.6 хранят в холодильнике в темных склянках.

27.2.7. 0,1%-ный спиртовый раствор фенолфталеина.

27.2.8. 0,1 М ацетатный буфер, pH 4,0. В мерной колбе на 1 л растворяют 13,410 г хч уксуснокислого натрия ($CH_3COONa.3\ H_2O$), приливают 25 мл ледяной уксусной кислоты хч и доводят водой до метки. Далее буфер фильтруют и определяют pH. Хранят при +4°С.

27.2.9. 0,01%-ный раствор дифенилкарбазона в бензоле. 10 мг реактива переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40–50 мл бензола хч и нагревают в стакане с горячей водой до растворения реактива. Колбу охлаждают и доводят бензолом до метки. Раствор может сохраняться в комнатных условиях в темной склянке две недели.

27.2.10. Основной стандартный раствор железа (100 мкг/мл): 0,8634 г х.ч. железоаммонийных квасцов ($NH_4\ Fe(\ O_4)_2.12\ H_2O$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочие растворы, содержащие от 1 до 5 мкг железа в 1 мл. Пробы должны содержать от 0,5 до 20 мкг железа.

27.2.11. Основной стандартный раствор меди (100 мкг/мл): 0,3928 г свежеперекристаллизованной сернокислой меди ($C\ O_4.5\ H_2O$)

растворяют в I л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор, содержащий 2 мкг меди в I мл (2 мл основного раствора в I00 мл). Берут 0,I; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; I,0 и I,5 мл рабочего раствора, доводят до 5 мл водой, добавляют по 0,5 мл 0,5 н HCI, I капле фенолфталеина и далее по ходу определения меди. Пробы содержат 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; I,0; 2,0 и 3,0 мкг меди соответственно. При необходимости следует приготовить серию рабочих растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг С /мл.

7.3. Количество необходимых реактивов на I00 анализов

7.3.I. Азотная кислота концентрированная, хч - I00 мл.
7.3.2. Соляная кислота концентрированная, хч - I л.
7.3.3. Фенолфталеин - I00 мг.
7.3.4. Аммиак водный 25%-ный - I00 мл.
7.3.5. Уксусная кислота ледяная - 3 мл.
7.3.6. Натрий уксуснокислый - I,5 г.
7.3.7. Бензол - 250 мл.
7.3.8. Дифенилкарбазон - 50 мг.
7.3.9. п-нитрофенол - I0 мг.
7.3.I0. Аскорбиновая кислота - 0,5 г.
7.3.II. Солянокислый о-фенантролин - 0,5 г.

7.4. Специальное оборудование и аппаратура

7.4.I. Фотоэлектроколориметр.
7.4.2. Тигли фарфоровые.
7.4.3. Весы аналитические.
7.4.4. Шкаф сушильный.
7.4.5. Муфельная печь.
7.4.6. Электроплитка.
7.4.7. Пробирки с притертой пробкой.
7.4.8. Колбы мерные на I00 и I000 мл.
7.4.9. Стеклянные палочки.
7.4.I0. Пипетки измерительные.

7.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит цельная кровь.

7.6. Ход определения

7.6.I. В фарфоровый тигель вносят 0,5 г воздушно-сухого вещества

корма или 2 мл крови, или 5 мл молока и сжигают в муфельной печи при температуре 550-600°С в течение 5-7 часов.

27.6.2. Если озоления полностью не произошло, то тигель охлаждают добавляют I мл 50%-ного раствора азотной кислоты, осторожно выпаривают на электроплитке и снова помещают в муфельную печь на 2-3 часа.

27.6.3. В тигель приливают 5-6 мл 2 н раствор соляной кислоты, доводят до кипения, а затем переносят в пробирку с меткой на I0 мл. Тигель споласкивают бидистиллированной водой и объем доводят до метки.

27.6.4. Определение меди. 5 мл раствора золы вносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют I каплю 0,I%-ного раствора фенолфталеина, добавляют по каплям I0%-ный раствор аммиак до появления светло-розовой окраски. В случае перетитрования добавляют по каплям 2 н раствор соляной кислоты до получения нужной окраски. Для точного установления pH прибавляют I мл ацетатного буфера. Розовая окраска исчезает. Затем в пробирку вносят 5 мл 0,0I%-ного раствора дифенилкарбазона (из бюретки на 50 мл) и встряхивают в течение минуты. После расслоения верхний слой приобретает красну окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству меди в пробе. Оптическую плотность верхнего слоя измеряют на ФЭКе при 540 нм кювете с толщиной слоя I см против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

27.6.5. Определение железа. 2,5 мл раствора золы вносят в пробирку с меткой на 5 мл, добавляют I каплю 0,I%-ного раствора п-нитрофенола и нейтрализуют I0%-ным раствором аммиака до появления желтой окраски. Добавляют по каплям 0,5 н раствор соляной кислоты до исчезновения окраски. Затем вносят 5 капель I%-ного раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и через I0 мин добавляют 5 капель I%-ного раствора солянокислого о-фенантролина. Доводят бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Измеряют на ФЭКе при 5I0 нм против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

27.7. Расчеты результатов

Расчет ведут по формуле:

$$x = \frac{a \cdot \ldots \cdot 100}{в \cdot c}, \text{ где}$$

x - количество меди или железа, мкг%;

а - количество меди или железа по калибровочной кривой,мкг;
в - количество крови , мл;
с - количество раствора, взятого на анализ, мл;
- объем раствора золы, мл. Для меди равен 10 мл, для железа - 5 мл.
100 - коэффициент для пересчета в мкг%.

27.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±6%.

27.9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 30 анализов.

27.10. Физиологические пределы

Содержание меди и железа в крови животных представлено в таблице 2.

27.11.Источники литературы

Кузнецов С.Г. Одновременное определение железа и меди в биологических объектах. Ветеринария , 1973, 7, с. 103.

28. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНКА В КРОВИ С ДИТИЗОНОМ ПО ЧЕБОТАРЕВОЙ Н.А.

28.1. Принцип метода

Цинк с дитизоном образует комплексное соединение, интенсивность окраски которого зависит от концентрации элемента.

28.2. Реактивы

28.2.1. Основной раствор дитизона. В делительную воронку на 250 мл вносят 0,02 г дитизона и 100 мл четыреххлористого углерода. Энергично встряхивают в течение 15 мин. Приливают 100 мл бидистиллированной воды, в которую предварительно вносят 0,5 мл 25%-ного аммиака, и встряхивают 2-3 мин. Удаляют слой четыреххлористого углерода и промывают оранжевый раствор дитизона 10 мл четыреххлористого углерода. Промывку повторяют 2 раза, сливая каждый раз четыреххлористый углерод. После последней промывки приливают 2,5 мл разведенной серной кислоты (1:5) (появляются черные хлопья), перемешивают, добавляют 100 мл четыреххлористого углерода и встряхивают 1 мин. После разделения фаз раствор дитизона в четыреххлористом углероде сливают в чистую делительную воронку и встряхивают с 50 мл бидистиллированной воды.

в течение I мин для удаления серной кислоты. Промывку водой повторяют еще 2 раза. Раствор дитизона переливают в сухую склянку из темного стекла с притертой пробкой и хранят в холодильнике около месяца. Качество раствора проверяют, встряхивая пробу его (5 мл) в делительной воронке с 25 мл 0,0I н аммиака (0,7 мл 25%-ного раствора аммиака в I л воды) в течение 2-3 мин. Органический слой должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, то раствор дитизона для анализа не пригоден.

28.2.2. Рабочий раствор дитизона. Готовится перед проведением анализа. В сухую мерную колбу на I00 мл вносят 6 мл основного раствора дитизона и доводят до метки четыреххлористым углеродом. Хорошо перемешивают.

28.2.3. Ацетатный буферный раствор с pH 5. 27г уксуснокислого натрия вносят в мерную колбу на I л, растворяют в бидистиллированной воде: прибавляют 58 мл ледяной уксусной кислоты и доливают бидистиллированной воды до метки. В полученный раствор добавляют 25 мл 50%-ного раствора тиосульфата натрия (натрий серноватокислый, гипосульфит).

28.2.4. 20%-ный раствор соляной кислоты.

28.2.5. 0,3 н раствор соляной кислоты.

28.2.6. Стандартный раствор цинка основной. Вносят I00 мг металлического цинка в мерную колбу на I л, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и I0 мл 20%-ной соляной кислоты. После полного растворения цинка доливают бидистиллированной воды до метки. В I мл содержится I00 мкг цинка. При отсутствии металлического цинка можно использовать сернокислый цинк, хч. С этой целью 0,2469 г реактива ($7\ H_2O$) растворяют в I л бидистиллированной воды, предварительно подкисленной 5 мл серной кислоты. I мл основного раствора содержит I00 мкг цинка.

28.2.7. Рабочий стандартный раствор цинка. В мерную колбу на I00 мл вносят I мл основного стандартного раствора и доводят до метки 0,3 н соляной кислотой. В I мл содержится I мкг цинка. Готовят в день проведения анализов.

28.2.8. Очистка четыреххлористого углерода. К 500 мл реактива добавляют I0 г активированного угля, встряхивают 5 мин и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Очистку повторяют 2-3 раза с новой порцией угля. После этого четырех-

хлористый углерод перегоняют в стеклянном аппарате на шлифах. Четыреххлористый углерод марки "хч" и "осч", а также и другие реактивы можно использовать без очистки. Реактивы более низкой квалификации нужно обязательно очистить.

28.2.9. 50%-ный раствор тиосульфата натрия, 50 г. вещества растворяют в 50 мл бидистиллированной воды.

28.2.10. Аммиак водный, 25%-ный раствор.

28.2.11. Серная кислота, разведенная 1:5.

28.2.12. Активированный уголь.

28.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

28.3.1. Дитизон, хч - 0,2 г.

28.3.2. Четыреххлористый углерод, хч - 2500 мл.

28.3.3. Соляная кислота, хч - 500 мл.

28.3.4. Серная кислота, хч - 50 мл.

28.3.5. Аммиак 25%-ный раствор (концентрированный) - 100 мл.

28.3.6. Активированный уголь - 100 г.

28.3.7. Ледяная уксусная кислота, хч - 100 мл.

28.3.8. Тиосульфат натрия (гипосульфит натрия), хч - 13 г. Можно использовать реактив из фиксанала.

28.3.9. Натрий уксуснокислый трехводный, хч - 275 г.

28.4. Специальное оборудование и аппаратура

28.4.1. Фотоэлектроколориметр.

28.4.2. Муфельная печь.

28.4.3. Электроплитка.

28.4.4. Весы аналитические.

28.4.5. Сушильный шкаф.

28.4.6. Перегонный аппарат стеклянный.

28.4.7. Тигли фарфоровые.

28.4.8. Делительные воронки на 250 и 500 мл.

28.4.9. мерные колбы на 50, 100, 1000 мл.

28.4.10. Бюретки на 50 мл.

28.4.11. Холодильник.

28.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит цельная кровь или сыворотка крови.

28.6. Ход определения

28.6.1. В фарфоровый тигель вносят 5 мл цельной крови и обугливают

на электроплитке, постоянно повышая температуру до 200-250°С. Затем пробы ставят в муфельную печь и сжигают при температуре 500-550°С в течение 3-4 часов. Если материал полностью не сгорел, в теплый тигель приливают 1-2 мл 50%-ной азотной кислоты, выпаривают на электроплитке, не допуская разбрызгивания раствора золы, и ставят в муфель на 1 час при температуре 500°С. При необходимости эту операцию повторяют.

28.6.2. Тигель охлаждают. Золу смачивают 5 мл 20%-ным раствором соляной кислоты и осторожно упаривают на электроплитке досуха, не допуская разбрызгивания массы и прокаливания остатка.

28.6.3. В тигель приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты, 5 мл бидистиллированной воды и нагревают на плитке до растворения золы.

28.6.4. Смесь охлаждают, переносят в пробирки с меткой на 25 мл (желательно с притертой пробкой) или в мерные колбы на 25 мл, смывая остатки из тигля бидистиллированной водой, доводят объем до метки и перемешивают.

28.6.5. В делительную воронку или в пробирку с притертой пробкой объемом 40-50 мл вносят 5 мл раствора золы, прибавляют 10 мл ацетатного буфера и перемешивают.

28.6.6. Приливают из бюретки 10 мл рабочего раствора дитизона и встряхивают делительную воронку в течение 1 мин.

28.6.7. После разделения фаз органический слой сливают в кювету объемом на 10 мл и фотометрируют на ФЭКе при 538 нм (зеленый светофильтр) против контроля. При использовании пробирок верхний водный слой отсасывают при помощи водоструйного насоса или отбирают сразу нижний слой пипеткой с грушей. При хорошем качестве реактивов цвет не должен изменяться в течение суток.

28.7. Расчеты результатов

28.7.1. Содержание цинка в образце находят по калибровочной кривой

28.7.2. Для построения калибровочной кривой в делительные воронки или пробирки с притертой пробкой вносят 1,2,3,4 и 5 мл рабочего стандартного раствора цинка. Объем до 5 мл доводят 0,3 н соляной кислотой. Далее поступают как и с образцами.

28.7.3. Расчет производят по формуле:

Цинк, мкг% = $\frac{a \cdot \_ \cdot 100}{в \cdot c}$, где

а - количество мкг цинка по калибровочной кривой;

в - количество крови, мл;

с - количество раствора золы, взятого для анализа, мл;

_ - объем раствора золы мл;

100 - коэффициент для пересчета в мкг%.

28.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет ±6%.

28.9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 20 анализов.

28.10. Физиологические пределы

Содержание цинка в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

28.11. Источники литературы

Чеботарева Н.А. Усовершенствованная методика определения цинка с дитизоном в кормах и растениях. "Химия в сельском хозяйстве",1977, № 9 стр. 50-52.

29. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА

29.1. Определение кислотности молока по Тернеру

29.1.1. В колбочку вносят 10 мл молока, 20 мл дистиллированной воды и 2 капли 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина.

29.1.2. Из бюретки медленно приливают 0,1 н раствор едкого натра до появления слаборозового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

29.1.3. Кислотность молока определяют путем умножения количества мл 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование, на коэффициент 10. Кислотность молока в норме 16-18°Т.

29.2. Определение ацетоновых тел в молоке реактивом Лестраде

29.2.1. Берут 1 г натрия нитропруссида, 20 г аммония сернокислого, 20 г натрия углекислого безводного и тщательно

измельчают в фарфоровой ступке. Хранят в закрытых банках из темного стекла. При длительном хранении (более 2 мес) активность реактива снижается.

29.2.2. На фильтровальную бумагу наносят на кончике скальпеля реактив Лестраде и смачивают его 2-3 каплями молока. Появление через 0,5-I,0 мин сиреневого или розового окрашивания свидетельствует о наличии ацетоновых тел (ацетона и ацетоуксусной кислоты)в молоке выше I0 мг%. Чем интенсивнее окраска смеси, тем выше концентрация ацетоновых тел в молоке. У здоровых коров не превышает 8 мг%.

29.3. Определение в молоке (молозиве)витамина А, макро- и микроэлементов

Используются методы, описанные при исследовании крови.

29.4. Источники литературы

29.4.I. Биохимические методы исследования в клинике. Под редакцией академика АМН СССР А.А. Покровского. М.:Медицина, I969, с. 463-469.

29.4.2. Давыдов Р.Б. Молоко и молочное дело. М.:Колос,I973, с. 35-4I.

29.4.3. Беляков И.М. Диагностика внутренних незаразных болезней сельскохозяйственных животных. М., Колос, I975 стр. 220-223.

30. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

30.I. Определение pH мочи универсальной индикаторной бумагой производится непосредственно на ферме. В норме у крупного рогатого скота 7,7 - 8,7, у свиней 6,5 - 7,8. При белковом перекорме моча кислая.

30.2. Удельный вес мочи определяется урометром . В норме у крупного рогатого скота I,0I5-I,045, у свиней I,0I5-I,025. Понижение удельного веса наблюдается при ацетонемии, повышение - при расстройствах желудочно-кишечного тракта, сопровождающихся поносами.

30.3. Цвет, прозрачность, консистенцию мочи определяют визуально. В норм моча прозрачная и водянистая. Цвет у крупного

рогатого скота от светло-желтого до светло-коричневого, у свиней светло-желтая.

30.4. Запах мочи специфичен для каждого вида животного. Характерный запах бывает при ацетонурии, кетозе.

30.5. Определение ацетоновых тел в моче проводят также, как и в молоке (п.29.2.).

30.6. Определение белка в моче сульфасалициловой кислотой.

Р е а к т и в ы: 20%-ный раствор сульфасалициловой кислоты. При отсутствии этой кислоты, ее можно приготовить: к 26 мл салициловой кислоты добавляют 18-20 мл концентрированной серной кислоты и постепенно нагревают до температуры 95-100°. Состав превращается в кристаллическую массу сульфасалициловой кислоты. После охлаждения разводят водой до 150 мл. Получается 20%-ный раствор сульфасалициловой кислоты.

К 3-4 мл профильтрованной мочи добавляют 4-6 капель реактива. При положительной пробе появляется помутнение.

30.7. Определение сахара в моче. Большинство качественных проб основано на редуцирующей способности глюкозы.

30.7.1. П р о б а Н и л я н д е р а. Проба основана на восстановлении глюкозой нитрата висмута в металлический.

Р е а к т и в: 2 г нитрата висмута растирают в ступке с 4 г сегнетовой соли, растворяют в 100 мл 10%-ного едкого натрия и фильтруют. Получается бесцветный раствор, стойкий в посуде из темного стекла в течение длительного времени.

Качество реактива проверяют так: несколько миллилитров реактива Ниляндера разводят в 10 раз водой и нагревают. При кипячении жидкость не должна темнеть.

К моче добавляют реактив в соотношении 2.1 и кипятят 3 минуты. В присутствии сахара появляется коричнево-темное окрашивание и осадок при стоянии. При отрицательной пробе выпадает бесцветный осадок фосфатов. Чувствительность пробы - 0,12% сахара. Мочевая кислота, гемоглобин, салициловая кислота, антипирин, биомицин, тетрациклин и некоторые другие медикаменты пробу могут сделать положительной. Важно, чтобы количество реактива в пробе было не менее 1/3 объема мочи. При больших количествах солей аммония в моче $(CH_4)_2CO_3$ они связывают едкий натрий, отчего теряется необходимая для реакции щелочность.

30.7.2. Экспресс-анализ на сахар в моче. Для экспресс-анализа имеется специальный набор- два флакона: А (едкая щелочь в гранулах) и Б. 4 гранулы реактива А вносят в пробирку и добавляют по 0,5 мл мочи и дистиллированной воды. Затем вносят таблетку реактива Б, после чего пробирку встряхивать нельзя. В процессе реакции содержимое пробирки закипает. Реакция заканчивается через 2 минуты. Цвет жидкости в пробирке сравнивают с прилагаемой к набору цветной шкалы из пяти тестов: от 0% до 2% и более.

В нормальной моче содержится не более 0,02% глюкозы, и она обычными качественными пробами не выявляется.

Глюкозурия может быть физиологической и патологической. Физиологическая глюкозурия возникает при избыточном поедании легкоперевариых углеводистых кормов, например сахарной свеклы (алиментарная глюкозурия), при сильных возбуждениях, после введения диуретина, кофеина, кортикостероидов, при отравлении хлороформом, фосфором. Патологическая глюкозурия бывает при сахарном диабете, тиреотоксикозе, циррозе печени, снижении почечного порога для сахара.

30.8. Источники литературы

30.8.I. Беляков И.М. Диагностика внутренних незаразных болезней сельскохозяйственных животных. М.,Колос, 1975,стр. 205-212.

Таблица 2

Нормативы биохимических показателей крови

Показатели	Ед. изм.	Вид животных			
		Кр. рог. скот	Овца	Свинья	Курица
А. Цельная кровь					
Фосфор неорганический	мг%	4,5-6,0	4,5-6,5	4,0-6,0	4,0-6,0
Магний неорганический	мг%	2,0-3,0	2,0-3,0	2,5-3,5	2,0-2,7
Глюкоза	мг%	45-55	45-75	36-60	80-140
Кетоновые тела	мг%	I,0-6,0	0,5-2,5	3,0-7,0	
Медь	мкг%	90-II0	50-70	200-240	50-70
Цинк	мкг%	300-500	80-I00		
Кобальт	мкг%	3,0-5,0	3,0-5,0	2,5-5,0	2,0-3,0
Марганец	мкг%	I5-25	2,0-8,0	2,0-I0,0	
В. Плазма крови					
Натрий	мг%	320-340	320-340	320-340	350-380
Калий	мг%	I6-I9	I6-I9	I6-I9	I9-23
Щелочной резерв	об.%CO_2	50-60	48-60	45-55	48-55
С. Сыворотка крови					
Общий белок	г%	7,2-8,6	6,0-7,5	6,5-8,5	4,3-5,9
Белковые фракции					
Альбумины	%	30-50	35-50	40-55	3I-35
Альфа-глобулины	%	I2-20	I3-20	I4-20	I7-I9
Бета-глобулины	%	I0-I6	7-II	I6-2I	II-I3
Гамма-глобулины	%	25-40	20-46	I7-25	35-37
Мочевина	мг%	20-40	20-35	20-35	I4-22
Кальций общий	мг%	I0,0-I2,5	I0,0-I2,5	I0-I4	I5-27
Каротин					
в пастбищный период	мг%	0,9-2,8			
в стойловый период	мг%	0,4-I,0			
Витамин А					
в пастбищный период	мкг%	40-I50			
в стойловый период	мкг%	24-80			
Витамин С	мг%	0,6-I,5	0,4-0,8	0,2-I,2	
Йод (СБИ)	мкг%	4,0-5,0	4,0-5,0	4,0-5,0	
Щелочная фосфатаза	ед.Боданск	I,2-2,5	I,2-2,5	I,2-2,5	
Общие липиды	мг%	350-450		640-I200	
Холестерин общий	мг%	I80-240		90-I50	

СОДЕРЖАНИЕ

стр.

I. ВВЕДЕНИЕ 3
2. Отбор и подготовка проб крови 3
3. Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом 4
4. Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции 8
5. Определение белковых фракций в сыворотке крови нефелометрическим методом 10
6. Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмоноксимом 13
7. Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по цветной реакции с орто-толуидином 15
8. Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по методу Сомоджи 18
9. Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмоноксимом (вариант 2) 22
10. Определение общих липидов в сыворотке крови по Бауман . . . 25
11. Определение общего холестерина по Ильку. 26
12. Определение общего количества кетоновых тел в безбелковом фильтрате крови йодометрическим методом 28
13. Определение общего кальция в сыворотке крови комплексометрическим методом 31
14. Определение неорганического фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадат-молибдатным реактивом 33
15. Определение неорганического магния в безбелковом фильтрате крови с титановым желтым 36
16. Определение калия и натрия в плазме крови пламенной фотометрией 39
17. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу бета-глицерофосфата 42
18. Определение щелочного резерва в плазме крови диффузионным методом 45
19. Определение витамина А и каротина в плазме крови спектрофотометрическим методом 48
20. Определение витамина А в плазме крови колориметрическим методом 50

Стр.

21. Определение каротина в плазме крови фотометрическим методом 54
22. Определение витамина С в плазмее крови . . 56
23. Определение йода, связанного с белком в сыворотке крови по Акланду в модификации С. В. Силаевой . 58
24. Определение общих липидов в сыворотке крови с сульфофосфованилиновым реактивом 63
25. Определение кобальта в крови по методу Гусева С. И. в модификации Титовой А. А. 66
26. Определение марганца в крови перйодатным методом 6
27. Определение меди и железа в крови по Сенделу в модификации Кузнецова С. Г. 7
28. Определение цинка в крови с дитизоном по Чеботаревой Н. А. 75
29. Исследование молока 79
30. Исследование мочи 80

Л 105306 от 8.07.1981 г. Формат 60×84¹/₁₆
Тираж 500 экз. Печ. л. 5.25. Заказ 3131. Бесплатно.
Москва. Типография ВАСХНИЛ

gost.e-ecolog.ru