ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
НЕЗАРАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

СИСТЕМА МЕРОПРИЯТИЙ ПО БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

(Методические указания)

Воронеж 1989

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРОПРОМЫШЛЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
НЕЗАРАЗНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

СИСТЕМА МЕРОПРИЯТИЙ ПО БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

(Методические указания)

Воронеж 1989

Система мероприятий по борьбе с болезнями витаминной недостаточности в промышленном птицеводстве подготовлена научными сотрудниками ВНИИ незаразных болезней животных **Л. И. Войтов, Н. М. Федорова, В. П. Бездверный, А. М. Селиванова, Т. И. Рыбакина, В. А. Миронова**), Центральной ветеринарной лабораторией ГУВ СССР (**Т. Ф. Яковлева**), ведущими специалистами ГУВ СССР (**С. С. Яковлев, В. П. Новгородов**).

Система мероприятий по борьбе с болезнями витаминной недостаточности в промышленном птицеводстве предназначена для ветеринарных и зоотехнических специалистов птицеводческих хозяйств.

Система мероприятий по борьбе с болезнями витаминной недостаточности одобрена Главным управлением ветеринарии Госагропрома СССР 12 июля 1989 года.

© Всесоюзный научно-исследовательский институт незаразных болезней животных.

Общие вопросы

Экономический ущерб, наносимый промышленному птицеводству болезнями витаминной недостаточности, складывается из снижения оплодотворяемости яиц и выводимости, задержки роста и развития молодняка, снижения количества и качества птицеводческой продукции и значительной гибели птиц.

Кроме того, нарушение витаминного обмена понижает общую неспецифическую резистентность организма птиц и создает предпосылку для возникновения заболеваний инфекционной этиологии.

Причины, обуславливающие гиповитаминозы

Раньше болезни витаминной недостаточности были следствием несбалансированности рациона и недостаточного содержания витаминов в кормах, в настоящее время, когда рационы для птиц обогащают в необходимом количестве витаминными премиксами, возникновение гиповитаминозов обусловлено следующими причинами:

а) использование кормовых ингредиентов, увеличивающих потребность организма птиц в витаминах (белки и жиры животного и растительного происхождения, содержащих высокий уровень непредельных углеводородов, госсипола, уреазы и перекисей липидов, а также грибковые токсины);

б) введение в кормовые смеси или дача с водой лекарственных препаратов, являющихся антагонистами витаминного обмена (антибиотики, кокцидиостатики, сульфаниламидные и нитрофурановые препараты);

в) действие на птиц неблагоприятных факторов, повышающих их потребность в витаминах (вакцинация, диагностические исследования, перевозка и пересадка, переуплотненность, загазованность помещений и др.);

г) диспропорция отдельных витаминов в кормах и неравномерное распределение витаминов и премикса в кормовых смесях, чему способствует дополнительное обогащение кормов витаминами непосредственно в хозяйствах, без надлежащей эмульгации жирорастворимых витаминов и растворение в воде водорастворимых витаминов;

д) снижение активности витаминов в премиксе и в витаминных препаратах, имеющихся в хозяйстве.

Диагностика

В птицеводческих хозяйствах чаще диагностируют смешанные формы гипо- и гипервитаминозов, что свидетельствует о том, что дефицит или избыток одного из витаминов в организме птицы неизбежно сопровождается снижением активности других витаминов.

При определении уровня витаминной обеспеченности птицы необходимо учитывать возраст и продуктивную направленность, так как у мясной птицы (бройлеры, индейки, утки и гуси) чаще диагностируется дефицит витаминов Е, К, С, у птиц яичного направления — недостаток или избыток витаминов А, $Д_3$, $В_2$. Несколько чаще встречают гиповитаминозы К, $В_2$, $В_1$ у птиц при клеточном содержании и это обстоятельство необходимо учитывать при выяснении причины гиповитаминоза и профилактики заболевания.

Наиболее достоверными методами диагностики гипо- и гипервитаминозов являются биохимические способы определения витаминов в депонирующем органе.

Систематический контроль за содержанием витаминов в организме птиц позволяет устанавливать нарушение витаминного обмена на ранних стадиях. когда в организме еще не наступили необратимые функциональные и морофологические изменения и его значительно быстрее можно вывести из такого состояния.

Одним из основных объектов биохимического контроля должна быть племенная птица, так как от ее физиологического состояния во многом зависит биологическая полноценность инкубационного яйца и жизнеспособность молодняка в первые дни жизни.

Контроль за быстрорастущим организмом бройлеров необходимо осуществлять не менее 2 раз в месяц, а исследование ремонтного молодняка, взрослой птицы и инкубационного яйца следует проводить не менее одного раза в месяц.

Биохимическому исследованию подвергают клинически здоровую птицу. Исследование больных птиц, так называемый санбрак, дает необъективные показатели по обеспеченности витаминами. Печень от павшей птицы не исследуют на содержание витаминов.

Диагностика А-гиповитаминоза. Осуществляют на основании патологоанатомических изменений и биохимических исследований.

В настоящее время в промышленном птицеводстве редко встречаются болезни А-витаминной недостаточности с характерными патологоморфологическими изменениями. Чаще в птицеводческих хозяйствах диагностируют гипервитаминозы А, для которых характерны те же патологоморфологические изменения, что и для дефицита витамина А (ломкость перьев, кожные дерматиты, кератоконъюнктивиты и гиперкератоз слизистых оболочек).

Лабораторная диагностика А-витаминной обеспеченности организма птиц наиболее достоверна при использовании спектрофотометрического метода.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА А И КАРОТИНОИДОВ В ПЕЧЕНИ И ЯЙЦЕ

Принцип метода. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротиноидов из измельченной ткани при помощи малолетучих растворителей и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором до и после разрушения витамина А ультрафиолетовыми лучами при длине волны 328 нм и 460 нм для каротиноидов.

Реактивы. 96%-й этиловый спирт, ксилол или о-ксилол (ч), октан х. ч., калий едкий, 1 н раствор едкого калия в 96%-м этиловом спирте. К 1 объему 11 н раствора едкого калия добавить 10 объемов этилового спирта. Раствор готовится в день проведения анализов, 11 н раствор едкого калия: 617,16 г едкого калия доводят дистиллированной водой в колбе на 1 л, ксилоло-октановая смесь (1 : 1). Готовят в день проведения анализов.

Оборудование. Спектрофотометр, ультрафиолетовая лампа ПРК-4, центрифуга, водяная баня, вентилятор настольный, пробирки из стекла пирекс, пропускающие ультрафиолетовые лучи, 55×8 мм, центрифужные пробирки, пипетки градуированные на 1, 5, 10 мл, стеклянные палочки.

Ход определения. Для исследования используют свежую или хранившуюся в замороженном состоянии печень. Пробу печени тщательно растирают в фарфоровой ступке, затем взвешивают 0,5 г полученной гомогенной массы (таким же образом готовят для анализа пробу желтка, только желток в количестве 1 г отвешивают непосредственно в центрифужную пробирку).

Навеску печени количественно переносят в центрифуж-

ную пробирку и приливают 2 мл 1 н спиртового раствора едкого калия. Перемешивают стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза на водяную баню при температуре 60°С на 30 минут. После этого пробирки охлаждают в холодной воде в течение 5—10 минут и добавляют в каждую 8 мл ксилоло-октановой смеси. Пробирки закрывают пробками и сильно встряхивают в течение 2 мин., после чего центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Верхний слой центрифугата переносят пипеткой в кварцевую кювету спектрофотометра и калориметрируют: каротиноиды определяют при длине волны 460 нм, витамин А путем двукратного измерения, до и после облучения проб ультрафиолетовыми лучами, при длине волны 328 нм. Для этого исследуемые пробы переносят из кювет в пробирки из стекла пирекс и облучают 45—60 мин лампой ПРК-4 на расстоянии 15—19 см. Для того чтобы пробирки не нагревались, во время облучения их охлаждают с помощью настольного вентилятора. Концентрацию витамина А определяют по разности отсчетов при спектрофотометрировании до и после облучения.

Расчет. Содержание каротиноидов определяют по формуле:

$$X = 4{,}8 \cdot E \cdot 2 \cdot п, \text{ где}$$

X — искомое содержание каротиноидов в мкг/г;
4,8 — коэффициент по Бессею для каротина;
E — оптическая плотность пробы при 460 нм;
2 — коэффициент пересчета на 1 грамм печени;
п — разведение (количество мл ксилоло-октановой смеси).

Определение содержания витамина А производят по формуле:

$$X = 6{,}37 \cdot (E_1 - E_2) \cdot 2 \cdot п, \text{ где}$$

X — содержание витамина А в мкг/г;
6,37 — коэффициент для витамина А по Бессею;
E_1 — оптическая плотность раствора витамина А до облучения при 328 нм;
E_2 — оптическая плотность раствора витамина А после облучения при 328 нм;
2 — коэффициент пересчета на 1 грамм печени;
п — разведение.

При высоком содержании витамина А в печени нужно проводить дополнительное разведение. Это дополнительное разведение учитывают в формуле расчета.

Диагностика Е-гиповитаминоза. Болезни Е-витаминной недостаточности у молодняка птиц проявляются большим разнообразием клинических признаков и патологоанатомических изменений (энцефаломаляция, экссудативный диатез, беломышечная болезнь и токсическая дистрофия печени).

Диагностируют болезни Е-витаминной недостаточности комплексно по результатам патологоанатомических, гистологических и биохимических методов исследования.

Патологоанатомические изменения.

а) энцефаломаляция — восприимчив молодняк птиц 3—6-недельного возраста. Изменения локализуются преимущественно в мозжечке и проявляются кровоизлияниями, разрушением клеток мозговой ткани с последующим образованием очагов некроза, застойными явлениями.

В отдельных случаях морфологические изменения обнаруживают в скелетной мускулатуре и миокарде;

б) экссудативный диатез — восприимчив молодняк птиц 3—7-недельного возраста. Основным патологоанатомическим признаком этого заболевания являются обширные подкожные инфильтраты соломенного цвета в области головы, шеи, груди, конечностей. Иногда студневидные отеки наблюдаются в межтканевых пространствах внутренних органов и головном мозге. Кроме отеков в подкожной клетчатке, обнаруживаются изменения в миокарде (дистрофия) и в поджелудочной железе (очаговые некрозы);

в) беломышечная болезнь (миодистрофия), восприимчив молодняк птиц 2—4-недельного возраста. Довольно часто изменения, характерные для беломышечной болезни, диагностируются у 24—25-суточных эмбрионов индюшат, гусят и утят.

У индюшат патологоанатомические изменения обнаруживаются постоянно в мышечном желудке, значительно реже в миокарде и скелетной мускулатуре. Мышечный желудок уменьшен в объеме, несколько сплюснут, слегка упругой консистенции. На разрезе желудка обнаруживаются серо-белые участки пораженной мышечной ткани, придающие ему мозаичный рисунок. Сердечная мышца дряблая, иногда на фоне темно-розового цвета обнаруживаются серо-белые полоски и тяжи.

У цыплят и гусят морфологические изменения локализуются в скелетной мускулатуре грудной кости, конечностей. Пораженные участки мускулатуры имеют вид вареного мяса.

Большим разнообразием морфологических изменений характеризуется беломышечная болезнь утят. Так, в одних хозяйствах у больных утят поражается только мышечный желудок, у других — скелетная мускулатура, а у третьих — печень;

г) токсическая дистрофия печени утят — одна из форм проявления беломышечной болезни. Печень резко увеличена, заполняет всю брюшную полость, полнокровная, темно-вишневого цвета, дряблой, мажущейся консистенции. Капсула снимается легко. Сердечная мышца дряблая, грушевидной формы и пронизана тонкими серо-белыми полосками.

Лабораторная диагностика Е-витаминной обеспеченности организма птиц

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В ПЕЧЕНИ И ЯЙЦЕ

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции витамина Е с железодипиридиловым реактивом.

Реактивы. Ацетон, петролейный эфир (40—60°), 85%-я серная кислота, 2%-й гидроксид калия, железодипиридиловый реактив. Готовится следующим образом: 250 мг хлорного железа и 500 мг 2,2′-дипиридила растворяют в 1 л ледяной уксусной кислоты, реактив стабилизируется на 7—10 день. Хранить при комнатной температуре в посуде из темного стекла, бензол.

Посуда и оборудование. Ступка фарфоровая с пестиком, делительная воронка на 250—500 мл, колба на 50 мл, центрифужные пробирки, центрифуга, фотоэлектроколориметр, водяная баня, баллон с газообразным азотом.

Ход определения. Навеску печени или желтка в 2 г тщательно измельчают и растирают в ступке, заливают 30 мл ацетона, снова растирают, дают отстояться и верхний слой декантируют в делительную воронку, одновременно фильтруя через бумажный фильтр. Повторно витамин экстрагируют 30 мл смеси (ацетон 15 м + 15 мл петролейного эфира), третий раз смесью 10 мл ацетона + 20 мл петролейного эфира. Экстракты, собранные в делительную воронку 2 раза промывают 2—3-кратным объемом дистиллированной воды. Петролейно-

эфирный экстракт переносят в колбу и на водяной бане при температуре 60°С выпаривают в токе азота до объема 1,5—2 мл. Остаток выливают в градуированную пробирку (центрифужную). Колбу ополаскивают 1—2 мл петролейного эфира, который сливают в центрифужную пробирку, и объем жидкости в пробирке доводят петролейным эфиром до 5 мл. Для осаждения витаминов А и каротиноидов в пробирку к экстракту добавляют 2—3 мл серной кислоты, тщательно перемешивают содержимое в течение 2—3 мин. (встряхиванием), а затем для разделения слоев центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость пипеткой переносят в другую центрифужную пробирку в количестве 3,0 мл и остаток кислоты в ней нейтрализуют 2-%-м раствором КОН. Тщательно перемешивают 1—2 мин, затем центрифугируют 5 мин. 3 мл надосадочной жидкости выпаривают на водяной бане при температуре 60°С в токе азота и осадок растворяют в 1 мл бензола, а затем добавляют 2,0 мл железодипиридилового реактива. Выдерживают 20 минут в темном месте и колориметрируют при длине волны 490 нм, в кювете с рабочим расстоянием 5 мм против контроля. Контролем служит бензол + железодипиридиловый реактив.

Расчет ведут по формуле:

$$E = \frac{а \cdot у \cdot в}{м}, \text{ где}$$

Е — концентрация витамина в мг%;
а — количество витамина Е по калибровочной кривой;
у — объем раствора в кювете;
в — степень разведения (3);
м — количество печени (г).

Построение калибровочной кривой:

10 мг (чистого 96%-го α -токоферола) растворяют в колбе на 10 мл бензолом (20 мг%-й — основной раствор);

2,5 мл основного раствора растворяют в колбе на 25 мл (2 мг%-й р-р);

к 5 мл (2 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл бензола (1 мг%-й р-р);

к 5 мл (1 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл бензола (0,5 мг%-й р-р);

к 5 мл (0,5 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл бензола (0,25 мг%-й р-р);

к 5 мл (0,25 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл бензола (0,125 мг%-й р-р).

Далее в пробирку по 1 мл каждого разведения прибавляют 1 мл бензола и 2 мл железодипиридилового реактива. Контроль: 2 мл бензола и 4 мл железодипиридилового реактива.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции хлорного железа, с витамином Е в присутствии 2,2′-дипиридила.

Реактивы. Гексан, этанол 96°, хлороформ, 2%-й р-р хлорного железа, 2%-й р-р 2,2′-дипиридила (на абсолютном спирте).

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, водяная баня, центрифуга, баллон с газообразным азотом, фотоэлектроколориметр.

Ход определения. В центрифужную пробирку, содержащую 1 мл сыворотки, добавляют 2 мл 96° спирта, 3 мл гексана и 1 мл дистиллированной воды. Затем через полученный раствор несколько секунд пропускают азот, после чего пробирки закрывают пробками и тщательно встряхивают в течение 1—2 минут. Одновременно, подобным образом, обрабатывают контрольную пробу, вместо сыворотки берут 1 мл дистиллированной воды. После встряхивания пробы центрифугируют в течение 10 минут при 1500 об/мин. Затем отбирают 2 мл надосадочной жидкости и выпаривают на водяной бане в токе азота (водяная баня при температуре 60°С). После выпаривания в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл хлороформа, 2 мл этанола, 0,2 мл 2%-го раствора 2,2′-дипиридила, 0,2 мл 2%-го раствора хлорного железа. Пробы встряхивают 10 сек и колориметрируют на фотоэлектроколориметре при длине волны 520 нм не позже 40 сек, в кювете с рабочим расстоянием 5 мм против контроля. Контролем служит 0,2 мл хлороформа + 2 мл этанола + 0,2 мл 2%-го раствора 2,2′-дипиридила + 0,2 мл 2%-го раствора хлорного железа. Содержание витамина Е находят по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой

Основной раствор (20 мг%-й) готовится следующим образом:

10 мг (чистого 96%-го α -токоферола) растворяют в колбе на 50 мл абсолютным спиртом.

Для построения калибровочной кривой готовят рабочие растворы:

2,5 мл основного раствора растворяют в колбе на 25 мл (2 мг%-й р-р);

к 5 мл (2 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл абсолютного спирта (1,0 мг%-й р-р);

к 5 мл (1,0 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл абсолютного спирта (0,5 мг%-й р-р);

к 5 мл (0,5 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл абсолютного спирта (0,25 мг%-й р-р);

к 5 мл (0,25 мг%-го р-ра) добавляют 5 мл абсолютного спирта (0,125 мг%-й р-р).

В центрифужные пробирки берут по 1 мл каждого разведения. Все остальные операции выполняют в том же порядке, как описано выше.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ Е-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ

Принцип метода. Витамин Е, участвуя в углеводном, белковом и липидном обмене, способствует сохранению целостности клеточных мембран. Одной из форм проявления гиповитаминоза Е является нарушение липопротеиновых оболочек клеток и их субклеточных органелл. В полной мере недостаток токоферола отражается и на состоянии эритроцитарных мембран, в результате чего снижается устойчивость эритроцитов к действию лизирующих веществ. На этой биологической зависимости основан метод тест-гемолиза эритроцитов с лимонной кислотой, который используется для диагностики Е-витаминной недостаточности у птиц.

Реактивы. Фосфатный буфер (14,2 г безводного фосфорнокислого двузамещенного натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды, pH 7,4 доводят 1н раствором соляной кислоты), 0,89%-й раствор хлористого натрия, солефосфатный раствор (смесь равных частей фосфатного буфера и солевого раствора), 0,1%-й раствор лимонной кислоты на солефосфатном растворе.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные на 10 мл, пипетки на 1—5 мл и микропипетки на 0,1 мл, фотоэлектроколориметр, термостат, центрифуга.

Ход определения. В центрифужную пробирку, содержащую 3 мл солефосфатного раствора, добавляют 0,03 мл крови, взятой из подкрыльцовой вены, смешивают и центрифугируют 10 мин при 1500—2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. К осадку эритроцитов добавляют 3 мл солефосфатного раствора, осторожно смешивают до однородной взвеси, а затем переносят по 1 мл в три пробирки. В первую и вторую пробирку добавляют по 1 мл 0,1% раствора лимонной кислоты, а в третью — 1 мл солефосфатного раствора и выдерживают в термостате 30 мин. при температуре 40°С, а затем 1 ч. при комнатной температуре. После этого в первую и третью пробирки добавляют по 3 мл солефосфатного раствора, а во вторую — 3 мл дистиллированной воды. Содержимое каждой пробирки осторожно перемешивают и центрифугируют при 1500—2000 об/мин 10 мин. Надосадочную жидкость каждой пробирки колориметрируют (светофильтр №.3, длина волны 410—415 нм). Контролем служит солефосфатный раствор.

Гемолиз в процентах вычисляют по формуле:

$$(а—в) : (б—в) \times 100, \text{ где}$$

а — показание ФЭКа при исследовании содержимого первой пробирки;

б — показание ФЭКа при исследовании содержимого второй пробирки;

в — показание ФЭКа при исследовании содержимого третьей пробирки.

Во избежание ошибки при определении следует пользоваться чистой стеклянной посудой, ополаскивая ее спиртом и тщательно просушивая. Нельзя сильно встряхивать пробирки с кровью, особенно после инкубации в термостате, иначе может произойти механический гемолиз эритроцитов.

Диагностическое значение. У клинически здоровой птицы в реакции с лимонной кислотой гемолизируется не более 8% эритроцитов, что соответствует физиологическому содержанию токоферола в сыворотке крови: 0,85—1,2 мг%.

При уменьшении запасов витамина Е в организме устойчивость эритроцитов к гемолизу снижается. Так, гемолиз эритроцитов 10% и выше оценивается как показатель Е-витаминной недостаточности. Чем выше гемолиз эритроцитов, тем более четко у птицы проявляются клинические признаки гиповитаминоза Е.

Диагностика гиповитаминоза К. К-витаминную недостаточность у птиц диагностируют на основании клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов биохимических исследований печени и сыворотки крови больных птиц.

Основными клиническими симптомами недостатка витамина К у птиц являются массовые кровоизлияния или кровотечения, возникающие при незначительных повреждениях сосудов и продолжающиеся длительное время из-за замедленной свертываемости крови.

При дефиците витамина К у несушек родительского стада птица несет большое количество яиц с кровяными пятнами. Из таких яиц выводится молодняк с повышенной кровоточивостью, который погибает в первые дни жизни от незначительных повреждений сосудов (прикрепление крылометок, обрезание клюва).

Патологоанатомические изменения

У павших птиц обнаруживается картина обескровливания тканей и органов, скопление плохо свернувшейся крови в полостях, под кожей, в межмышечных пространствах, под серозными оболочками.

Геморрагические явления у больных птиц могут быть в любой части тела, подвергшейся механическому воздействию или сильному мышечному напряжению, но, в основном, появляются в области головы, крыльев, грудных и бедренных мышц, в кутикулярном слое, мышечном слое мышечного желудка, под капсулой печени и в толще паренхимы органа.

Характерным патологоанатомическим признаком при К-витаминной недостаточности у взрослых птиц являются гематомы под капсулой печени и в толще органа, у молодняка старшего возраста — геморрагические кровоподтеки в межмышечных пространствах и кровоизлияния под кожей, а у молодняка первых дней жизни — очагово-язвенные кутикулиты.

Лабораторная диагностика

Из биохимических методов исследований наиболее достоверными являются: прямой метод определения витамина К в печени и экспресс-метод определения протромбиновой активности крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА К В ПЕЧЕНИ ПО МЕТОДУ МЕЕРОВИЧА И МАРТИНСОНА

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции 2 метил-1,4 нафтохинона с анилином.

Реактивы. Анилин, петролейный эфир, витамин K_1 (масляный — 96%-й).

Посуда и оборудование. Фотоэлектроколориметр, центрифуга, весы аналитические, ступки фарфоровые с пестиком, делительные воронки емкостью 50 мл, центрифужные пробирки, мерные пипетки на 5 мл.

Ход определения. Навеску печени в 1 грамм тщательно растирают в ступке. Растертую массу переводят в делительную воронку и ступку смывают 5 мл воды. Прибавляют сюда же 10 мл петролейного эфира. Всю массу взбалтывают в течение 5 мин, затем переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 15 минут при 1500 об/мин. После центрифугирования берут 5 мл надосадочной жидкости, приливают 2 мл анилина, встряхивают в течение 2 минут и ставят центрифугировать 5 минут при 1500 об/мин. Затем верхний слой выливают, а нижний слой колориметрируют на ФЭКе, кювета № 3, светофильтр № 4 (фиолетовый). Контролем служит анилин. Содержание витамина К определяют по калибровочной кривой.

Построение калибровочной кривой

10 мг витамина K_1 растворяют в колбе на 50 мл петролейным эфиром (200 мкг/г);

25 мл раствора (200 мкг/г) + 25 мл петролейного эфира (100 мкг/г);

25 мл раствора (100 мкг/г) + 25 мл петролейного эфира (50 мкг/г);

25 мл раствора (50 мкг/г) + 25 мл петролейного эфира (25 мкг/г);

5 мл раствора (25 мкг/г) + 5 мл петролейного эфира (12,5 кмг/г).

Затем из каждой колбы берут 5 мл раствора, добавляют 2 мл анилина. Пробирку закрывают и смесь взбалтывают в течение 2 минут. Центрифугируют в течение 5 минут при 1500 об/мин. Затем нижний слой анилина колориметрируют на ФЭК. Контроль — анилин. Кювета № 3, светофильтр № 3.

ДИАГНОСТИКА К-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПТИЦ ПО ПРОТРОМБИНОВОЙ АКТИВНОСТИ КРОВИ

Принцип метода. При участии витамина К в организме птиц осуществляется синтез протромбина, проконвертина и некоторых других факторов свертывания крови. Существует корреляция между содержанием протромбина в крови и витамином К в организме птиц. «Протромбиновое время» (время, необходимое для образования в плазме крови сгустка из фибрина в присутствии проконвертина, тромбопластина и солей кальция) как показатель содержания в крови протромбина используется для определения обеспеченности организма птиц витамином К.

Реактивы. 0,85%-й физиологический раствор, 1,34%-й раствор щавелевокислого натрия (1,34 г на 100 мл дистиллированной воды), 0,277%—раствор хлористого кальция (0,277 г высушенного до постоянного веса и хранимого в эксикаторе хлористого кальция на 100 мл воды), лабораторный тромбопластин) (с активностью 22—27 с). Перед постановкой опыта берут 50 мг сухого препарата тромбопластина, растирают с 5 мл дистиллированной воды в фарфоровой ступке до получения однородной массы. Полученную суспензию переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 8—10 минут при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в пробирку и используют при постановке реакций. Разведенного тромбопластина (50 мг) достаточно для исследования 45—50 проб крови.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, пробирки Видаля, пипетки на 1,2 мл, микропипетки на 0,1—0,2 мл, водяная баня, секундомер, центрифуга.

Ход определения. Для получения объективных данных нужно исследовать кровь от 10—15 птиц, имеющих характерные для этой группы признаки. Исследуемая птица не позднее 6 часов до взятия крови должна получать достаточное количество питьевой воды. У нее не должно быть признаков заболевания печени. Кровь в количестве 0,4 мл берут пипеткой или шприцем из кровеносных сосудов крыла, ног (можно из сосудов шеи после декапитации) и выливают в центрифужные пробирки, содержащие 0,1 мл раствора щавелевокислого натрия. Для перемешивания крови с оксалатом

натрия пробирку слегка покачивают, а затем центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин. Надосадочную жидкость (плазму) отсасывают и пипеткой переносят в пробирку, где смешивают с равным количеством 0,85%-го раствора хлористого натрия.

В тонкостенную пробирку Видаля наливают 0,2 мл хлористого кальция и 0,1 мл разведенного тромбопластина. Пробирку помещают в водяную баню (40°С) и одновременно включают секундомер. Через 30 сек, не вынимая пробирки из бани, вводят в нее пипеткой 0,1 мл разведенной плазмы и слегка встряхивают до появления хлопьев или сгустков (лучше видны при проходящем свете). При появлении сгустков или хлопьев выключают секундомер, замечая время. «Протромбиновым» считается время, прошедшее с момента введения пробирки в водяную баню до появления хлопьев или сгустков, исключая 30 сек, затраченных на прогревание пробирки.

Если исследуемая кровь хранилась более 3 часов (при обычной температуре) с момента ее взятия, а также подвергалась замораживанию или в нее добавлено больше оксалата натрия, чем рекомендуется, то «протромбиновое время» значительно увеличивается.

Диагностическое значение. При достаточной насыщенности организма птиц витамином К среднее «протромбиновое время» у птиц при работе с гетерологичным тромбопластином (Кировский НИИ гематологии и переливания крови) составляет 45 сек. с пределами колебаний от 30—55 сек.

«Протромбиновое время» 60 и более секунд указывает на имеющийся дефицит витамина К в организме птиц.

При исследовании сыворотки крови с гомологичным ветеринарным тромбопластином (изготовлен из тканей суточных цыплят) — среднее «протромбиновое время» у птиц составляет 20 секунд с пределами колебаний 17—25 сек, что соответствует оптимальному содержанию в печени взрослых птиц витамина К-225 мкг/г с пределами колебаний 200—250 мкг/г и молодняка птиц 40 мкг/г с пределами колебаний 30—50 мкг/г.

Симптомы К-витаминной недостаточности наступают при увеличении «протромбинового времени» как для гетерологичного, так и для гомологичного тромбопластинов в 2 и более раз.

Это групповой экспресс-метод, и для объективной постановки диагноза необходимо исследовать кровь не менее 10 птиц.

Диагностика Д-гиповитаминоза. При дефиците витамина Д в организме птиц нарушаются процессы всасывания из кишечника фосфорнокислых солей, уменьшается количество кальция и фосфора в костях, в результате чего развивается рахит у молодняка и остеомаляция у взрослых птиц.

Развитию этой патологии во многом способствует недостаток или неправильное соотношение между кальцием и фосфором, так как регуляторное влияние витамина Д на соотношение кальция и фосфора ограничено определенными пределами.

Диагноз ставят, основываясь на данных анализа рациона, клинических патоморфологических признаков и биохимических исследований содержания витамина $Д_3$, кальция и фосфора.

Патоморфологические изменения

При вскрытии павшей птицы обращает на себя внимание синюшность слизистых оболочек. Основные изменения сосредоточены в трубчатых, плоских и смешанных костях.

У молодняка птиц кости мягкие, хрящеподобные, легко режутся или ломаются. Под влиянием веса тела, мышечных сокращений и других нагрузок они искривляются, изменяется фома грудной кости. В местах костно-хрящевых сочленений ребер возникают утолщения, называемые рахитическими четками.

У утят, кроме вышеописанных изменений, клюв мягкий, резиноподобный. У взрослых птиц патология проявляется декальцинацией (остеомаляция) костей с образованием неполноценной в функциональном и морфологическом отношении остеоидной и хрящевой ткани. В период интенсивной яйцекладки несушки несут большое количество яиц шероховатых с насечками и тонкой скорлупой или вообще без скорлупы.

Лабораторная диагностика

Из биохимических методов исследования используют определение витамина $Д_3$ в печени и экспресс-метод определения уровня лимонной кислоты в крови.

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Д В ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Метод основан на гидролизе исследуемого образца спиртовым раствором щелочи и отделении неомыляющейся фракции бензолом: удалении стеринов преципитацией с дигитанином, адсорбции токоферолов и каротиноидов на колонке с окисью алюминия, хроматографии на колонке с гумбрином с целью удаления витамина А, спектрофотометрического определения витамина Д по реакции с треххлористой сурьмой.

Реактивы. Бензол, свободный от тиофена и толуола, 1,2-дихлорэтан, 96° этанол (перегнанный), 72° этанол (75 мл 96° этанола + 25 мл дистиллированной воды, эфир серный, свободный от перекисей и кислот, эфир петролейный (фракция 40—70°), свободный от воды, ненасыщенных и ароматических углеводородов, 2%-й раствор дигитонина в 72° этаноле, гумбрин 60—100 меш, содержащий 11% воды.

Для хроматографии гумбрин предварительно измельчают на шаровой мельнице, просеивают через сито 110 меш. К 200 г просеянного гумбрина добавляют 500 мл 96° этанола, хорошо размешивают и кипятят полученную смесь в течение 2—3 мин. После отстаивания верхний слой сливают. К осадку добавляют 250 мл 96° этанола и еще раз кипятят в течение 2—3 мин. при постоянном помешивании. Затем смеси дают отстояться, надосадочную жидкость сливают, а осадок дважды промывают диэтиловым эфиром. Промытый гумбрин переносят на стеклянный фильтр (нутч-фильтр) № 1 и с помощью вакуумного насоса отсасывают излишнюю влагу, далее его помещают в сушильный шкаф при температуре 60° на 3 часа, а затем хранят в темной посуде с притертой пробкой. Перед употреблением гумбрин снова помещают в сушильный шкаф на 6 часов при температуре 105°, охлаждают в эксикаторе над хлористым кальцием 1—2 часа, взвешивают, вносят в него воду из расчета 11% от массы гумбрина.

Окись алюминия (щелочная). В колбе на 200 мл смешивают 75 г окиси алюминия для хроматографии (100—325 меш.) с 75 мл 2 н спиртового раствора едкого калия, подогревают на водяной бане 15 минут при температуре 80° и охлаждают. Затем фильтруют отсасыванием, сушат при 130° в вакууме и хранят в герметически закрытой колбе. Реактив Ниелда. Берут 22 г трехххлористой сурьмы и заливают 100 мл хлороформа. Из полученного раствора готовят 2%-й ра-

створ ацетилхлорида. Спустя 3 суток реактив готов к употреблению.

Основной стандартный раствор витамина Д. Растворяют 10 мг кристаллического витамина Д в 200 мл бензола и хранят в холодильнике в темной герметически закрытой посуде. Раствор стоек в течение 14 суток.

Рабочий стандартный раствор витамина Д. В мерную колбу емкостью 100 мл наливают 5 мл основного стандартного раствора и доводят бензолом д метки. 1 мл этого раствора содержит 2,5 мкг витамина Д.

Ход определения. В колбу на 300 мл берут 10 г тщательно измельченной печени, заливают 200 мл 75%-го спиртового раствора едкого калия, добавляют 0,5 г аскорбиновой кислоты, все тщательно перемешивают, после чего проводят гидролиз в течение 30 минут на водяной бане с обратным или воздушным холодильником при температуре кипения смеси 80°, не допуская бурного кипения. Далее колбу охлаждают под струей холодной воды, добавляют 50 мл 96° этанола, содержимое тщательно перемешивают и переносят в колбу с притертой пробкой (29 шлиф) на 1000 мл, добавляют 200 мл бензола, колбу закрывают и встряхивают до получения однородного раствора, затем приливают 400 мл дистиллированной воды и снова энергично встряхивают. Затем содержимое колбы переносят в делительную воронку на 1000 м, которую прочно закрепляют в штативе. После разделения слоев нижний водный слой отбрасывают (если разделение слоев медленное или нечеткое, необходимо добавить 10—20 мл 96° этанола). Бензольный экстракт промывают 80 мл 0,5 н водного раствора едкого калия, отмывают дистиллированной водой от щелочи порциями по 80 мл до нейтральной реакции по фенолфталеину, после чего бензольный экстракт сливают в колбу с сернокислым натрием (7—8 г) и ставят в темное место на 30—60 мин. Высушенный бензольный экстракт фильтруют через складчатый фильтр, при этом трижды промывая сернокислый натрий и фильтр бензолом (10—15 мл).

Отфильтрованный бензольный экстракт выпаривают под вакуумом в токе азота на роторно-вакуумном испарителе на водяной бане при температуре 80°. Затем колбу разъединяют с вакуумом и азотом и к сухому остатку быстро добавляют 20 мл 96° этилового спирта. Если сухой остаток не растворился, то колбу следует немного подогреть. Далее добавляют 8,6 мл дистиллированной воды. Раствор должен быть про-

зрачным, если этого явления не наблюдается, колбу необходимо подогреть для просветления раствора. Затем приливают 10 мл 2%-го спиртового раствора дигитонина и через 30 мин. образующийся в растворе осадок комплекса стеридигитонина отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр, смоченный 72° этанолом. Фильтр и колбу промывают 15 мл 72° этанола. К полученному фильтрату еще раз добавляют 10 мл 2%-го спиртового раствора дигитонина и ставят в холодильник до следующего дня (на 18—20 час.), предварительно плотно закрыв колбу притертой пробкой.

При определении витамина Д в других объектах обработку дигитонином можно проводить однократно, с выдерживанием образцов в холодильнике, лучше в морозильной камере, в течение 18—20 ч. Образующийся осадок снова фильтруют, как было указано выше, полученный фильтрат дважды экстрагируют в делительной воронке по 25 мл петролейным эфиром и промывают 20 мл 72° этилового спирта. Нижний спиртово-водный слой отбрасывают, а экстракт сливают для выпаривания в колбу, в которую вставлена обычная стеклянная воронка с бумажным фильтром, на дно которого помещают сернокислый натрий. Фильтр с сернокислым натрием промывают петролейным эфиром. Затем фильтрат выпаривают под током азота в роторно-вакуумном испарителе на водяной бане при температуре 60°С. Полученный сухой остаток растворяют в 10 мл петролейного эфира. В итоге выполненных операций получается раствор А.

С целью удаления каротиноидов и токоферолов, которые мешают определению витамина Д, проводят колоночную хроматографию на окиси алюминия. Для этого в колбу Эрленмейера на 50 мл к 5 г щелочной окиси алюминия добавляют 0,55 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой, нагревают 5 мин. на водяной бане при 80°С и встряхивают до образованию рыхлого порошка. Колбу охлаждают, и окись алюминия переносят в хроматографическую колонку (0,7 см), в узкой части которой помещена вата. Затем пропускают через приготовленную колонку с окисью алюминия 10 мл петролейного эфира и переносят раствор А. Далее сразу же после прохождения раствора А через окись алюминия проводят элюцию, вначале дважды по 5 мл и один раз 40 мл 1%-го раствора диэтилового эфира в петролейном эфире, а затем 50 мл 10%-го раствора диэтилового эфира в петролейном эфире. Собранный элюат выпаривают досуха

в роторно-вакуумном испарителе в токе азота на водяной бане при 60°. Сухой остаток быстро растворяют в 10 мл петролейного эфира. Полученный раствор условно называют раствором Б.

Для отделения витамина А от витамина Д, который также дает цветную реакцию с треххлористой сурьмой и мешает определению витамина Д, используют хроматографию на гумбрине. Для этого берут хроматографическую колонку (α =1 см), узкую часть которой заполняют ватой, затем помещают 27 г подготовленного для хроматографии гумбрина (при определении витамина Д в плазме количество гумбрина можно уменьшить до 9—18 г), пропускают через гумбрин 10 мл петролейного эфира и переносят раствор Б. После прохождения раствора Б колонку промывают (элюируют) бензолом дважды по 5 мл и один раз 50 мл. По окончании элюции раствор выпаривают досуха в роторно-вакуумном испарителе под током азота на водяной бане при температуре 80°С. Сухой остаток в колбе растворяют в 1 мл 1,2-дихлорэтана. Это раствор С.

Измерение. К раствору С добавляют 2 мл раствора Нилда и взбалтывают, затем переливают раствор в кювету и через 45 и 90 сек после добавления реактива Нилда измеряют на спектрофотометре оптическую плотность пробы против пустой кюветы сначала при длине волны 500 нм, а затем при 550 нм.

Стандартный раствор. Берут 2 мл рабочего стандартного раствора витамина Д и переносят в колбу. Затем раствор выпаривают на водяной бане при температуре 80°С под вакуумом в токе азота. Колбу быстро охлаждают и осадок растворяют в 1 мл 1,2-дихлорэтана. В дальнейшем выполняют манипуляции, описанные в разделе «Измерение». Содержание витамина Д выражают в интернациональных единицах (ИЕ) на 1 г (или мл) образца. Расчет ведут по следующей формуле:

$$X = \frac{M_2 \cdot (A_1 - A_2) \cdot 40}{M_1 \cdot (A_3 - A_4)}$$

A_1 — оптическая плотность опытной пробы при 500 нм;
A_2 — оптическая плотность опытной пробы при 550 нм;
A_3 — оптическая плотность стандартной пробы при 500 нм;
A_4 — оптическая плотность стандартной пробы при 550 нм;
M_1 — навеска образца (печени), взятая для анализа, в г;
M_2 — количество витамина Д в стандартной пробе;
40 — коэффициент пересчета в ИЕ.

Например: Для анализа взяли 10 г печени, оптическая плотность (экстинкция) раствора, полученного из опытного образца (раствора С), при длине волны 500 нм равна 0,125, а при длине волны 550 нм — 0,070. Оптическая плотность стандартного раствора при длине волны 500 нм равна 0,270, а при длине волны 550 нм равна 0,050. Количество витамина Д в стандартном растворе 5 мкг (в 1 мл — 2,5 мкг), 40 — коэффициент для пересчета результата анализа в интернациональные единицы.

$$X = \frac{5\ (0{,}125 - 0{,}070) \cdot 40}{10\ (0{,}270 - 0{,}050)} = 5{,}00 \text{ ИЕ./г}$$

ДИАГНОСТИКА Д-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО УРОВНЮ ЛИМОННОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ

Принцип метода. Метод основан на фотометрическом определении интенсивности окраски при цветной реакции лимонной кислоты с пиридином в уксусном ангидриде.

Реактивы. 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты уксусный ангидрид, пиридин безводный. Основной стандартный раствор лимонной кислоты (20 мг б/в лимонной кислоты х. ч. или ч. д. а. растворяют в 100 мл 10% ТХУ).

Посуда и оборудование. Центрифужные и химические пробирки, пипетки на 1,10 мл, водяная баня, отрегулированная на 60°С, ФЭК.

Ход определения. Берут в центрифужную пробирку 1 мл 10%-го раствора ТХУ и сюда же добавляют 1 мл крови. Смешивают, выдерживают 10 мин. и центрифугируют 10—15 мин. при 1500 об/мин. Отбирают 1 мл безбелкового экстракта в химическую пробирку. Сюда же добавляют 8 мл (точно) уксусного ангидрида, закрывают пробкой и помещают в водяную баню с постоянной температурой 60°±1°С. Через 10 мин. в пробирку добавляют 1 мл пиридина безводного, закрывают пробкой и оставляют в водяной бане на 40 мин, затем переносят на 5 мин. в сосуд с холодной водой. Отсчет ведут на ФЭКе (светофильтр 3, длина волны 400—420 нм, кювета № 10).

Для установки прибора проводят холостой опыт с 1 мл 10% ТХУ вместо исследуемого экстракта тканей, все остальное также.

Содержание лимонной кислоты определяют по калибро-

вочной кривой, которую строят на основании определения вещества в серии разведений стандартного раствора.

Построение калибровочной кривой

Берут 25 мл основного 20 мг%-го р-ра + 25 мл 10% ТХУ — 10 мг% раствор лимонной кислоты;

25 мл (10 мг%-го) + 25 мл 10%го ТХУ — 5 мг%-го;

10 мл (5 мг%-го) + 10 мл 10%-го ТХУ — 2,5 мг%-го;

1 мл (10 мг%-го) + 9 мл 10%-го ТХУ — 1 мг%-го.

Затем из каждого разведения берем 1 мл раствора, далее, как описано в методике.

Диагностическое значение. В крови клинически здоровой птицы, обеспеченной витамином Д, содержится 5—6 мг% и более лимонной кислоты. При появлении начальных симптомов Д-витаминной недостаточности уровень кислоты снижается до 2—3 мг% и далее. Необходимо учитывать, что симптомы рахита и остеомаляции у птицы могут быть следствием дефицита в организме кальция и фосфора, поэтому определение последних в крови также обязательно.

Для получения объективных данных кровь исследуют у 10—15 особей из группы.

Диагностика гиповитаминоза B_1

Клинические симптомы и патологоанатомические изменения, особенно в начальной стадии тиаминовой недостаточности, малоспецифичны, поэтому основой диагностики гиповитаминоза на этой стадии его развития являются биохимические методы исследования.

Патологоморфологические изменения

Более четко выражены при сильной степени недостаточности тиамина.

У павших птиц обнаруживают атрофию скелетной и сердечной мускулатуры, половых органов, желудка, а также расширение сердца и гипертрофию надпочечников.

Обнаруживается ярко выраженная гиперемия мозга с симметрично расположенными геморрагическими очажками в сером веществе.

Лабораторная диагностика. Имеется два лабораторных метода определения тиаминовой обеспеченности организма птиц: а) прямой — по содержанию общего тиамина в печени и б) экспресс-метод по определению пировиноградной кислоты в крови.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ B_1-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО СОДЕРЖАНИЮ ОБЩЕГО ТИАМИНА В ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Определение общего тиамина в печени основано на его экстракции изобутиловым или изоамиловым спиртом, окислении красной кровяной солью в тиохром и количественном измерении по интенсивности флюоресценции.

Реактивы. Кристаллический препарат витамина B_1, 0,25 н р-р соляной кислоты, 20%-й р-р углекислого натрия, 20%-й р-р ТХУ, универсальная индикаторная бумага, 1%-й р-р красной кровяной соли (хранить в склянке из темного стекла), 30%-й р-р едкого натрия, изоамиловый или изобутиловый спирт, этиловый спирт 96°, фосфатаза.

Посуда и оборудование. Стаканчики Хагедорна (сахарные стаканчики), большие биологические пробирки (200×24) или цилиндры (100 мл) с притертой пробкой, центрифужные пробирки мерные, пипетки (10, 5, 2, 1 мл), ступки фарфоровые, водяная баня, термометр, центрифуга, термостат на 37°С, флюорометр.

Ход определения. 3 грамма печени растирают в ступке с кварцевым песком, приливают 15 мл 0,25 н раствора соляной кислоты, размешивают и выливают в стаканчик Хагедорна или большую пробирку. Ступку споласкивают 5 мл 0,25 н соляной кислоты и сливают в тот же стаканчик. Затем ставят стаканчик со смесью в кипящую водяную баню на 15 мин. Слегка охлаждают и доводят 20%-м раствором углекислого натрия до pH 5,2. Добавляют 3 капли хлороформа и 50 мг фосфатазы, закрывают ватной пробкой и ставят в термостат при 37°С на 24 часа. По истечении этого времени вынимают стаканчик из термостата и ставят в кипящую водяную баню на 3 мин. Смесь охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр (или лучше центрифугируют). К фильтрату прибавляют 2 мл 20%-го ТХУ. Ставят в водяную баню при 40—50°С на 10 мин, после чего снова фильтруют. Осадок на фильтре промывают 3 мл горячей бидистиллированной воды. К фильтрату (в больших пробирках) прибавляют двойной объем

изоамилового спирта и энергично встряхивают 2 мин, оставляют до разделения слоев (примерно 2 часа).

Затем верхний слой (изоамиловый) с посторонними флюоресцирующими веществами отбрасывают, а нижний (водный) делят на 2 части (равные), переносят их в чистые большие пробирки: одна служит опытом, другая — контролем. Приготовление основного стандартного раствора (10 мг тиамина в 100 мл воды), рабочий стандартный раствор — 1 мл основного р-ра доводят до 100 мл дистиллированной водой. 1 мл рабочего стандартного раствора доводится до 10 мл (в 1 мл содержится 0,1 мг тиамина) (рабочий раствор). Берут 1 мл рабочего раствора + 2 мл красной кровяной соли + 2 мл NaOH (стандартная пробирка). В опытную пробирку прибавляют 4 мл смеси, состоящей из 2 мл 1%-го раствора красной кровяной соли и 2 мл 30%-го раствора едкого натрия (готовят перед анализом), и выдерживают 2 мин. В контрольную пробирку приливают 2 мл 30%-го раствора едкого натрия.

По истечении 2 мин в стандартную, опытную и контрольную пробирки прибавляют по 8 мл изоамилового спирта, встряхивают 2 мин и оставляют до разделения слоев на 6—24 часа. После разделения слоев отбрасывают теперь уже нижний водный слой, а верхний промывают, добавляют в него 4 мл бидистиллированной воды, слегка встряхивают и отстаивают. После чего нижний водный слой отбрасывают, а верхний переносят в мерные пробирки, доливают изоамиловым спиртом до 8 мл. Если есть помутнение, прибавляют еще 1 мл 96° этилового спирта для просветления и флюорометрируют. Стандартным раствором выставляем стрелку флюорометра на 80. Затем флюорометрируем опытную и контрольную пробирки. Расчет производится по формуле:

$$X = \frac{(а — в) \cdot к}{н} \text{ мкг/г, где:}$$

X — содержание B_1 в пробе в мкг/г;

а — показания флюорометра для опытной пробы;

в — показания флюорометра для контрольной пробы;

к — цена одного деления (равна 1);

н — навеска ткани.

ДИАГНОСТИКА ТИАМИНОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО УРОВНЮ ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТЫ В КРОВИ

Принцип метода. В основе метода определения пировиноградной кислоты лежит ее осаждение в виде 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ), дающего со щелочью соединение коричнево-красного цвета. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию пировиноградной кислоты в растворе и определяется фотометрически.

Реактивы. 10%-й раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 0,1%-й раствор 2,4-динитрофенилгидрозина (50 мг реактива растворяют в 10 мл концентрированной соляной кислоты при слабом подогревании, объем раствора доводят дистиллированной водой до 50 мл (хранят в холодильнике), концентрированная соляная кислота, 12%-й раствор едкого натрия, пировиноградная кислота или пировиноградноки слый натрий.

Посуда и оборудование. Пробирки центрифужные, стеклянные палочки, колбы, пипетки на 1,2 мл, фотоэлектроколориметр.

Ход определения. Берут 0,3 мл крови и смешивают в центрифужной пробирке с 0,7 мл дистиллированной воды. К гемолизату приливают 1 мл 10%-го раствора ТХУ, смешивают стеклянной палочкой и через 1—2 мин. центрифугируют при 1500 об/мин. в течение 15 мин. Надосадочную жидкость полностью сливают в пробирку, приливают 0,4 мл 0,1%-го раствора 2,4-ДНФГ, смешивают и на 20 мин. помещают в темное место при комнатной температуре. К содержимому пробирки приливают 1 мл 12%-го раствора едкого натрия и через 5 мин. определяют на ФЭКе оптическую плотность окрашенного раствора против контрольной пробы (готовят так же, как опытную пробу, только вместо крови берут воду). Светофильтр синий, длина волны 440 нм, кювета с толщиной слоя 5 мм. Количество пировиноградной кислоты рассчитывают по калибровочной кривой.

Приготовление основного стандартного раствора: 50 мг пировиноградной кислоты или 63 мг пировиноградноки слого натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды (1 мл содержит 0,5 мг или 500 мкг).

Рабочий раствор: берут 1 мл основного стандартного ра-

створа и доводят объем водой до 10 мл (1 мл содержит 50 мкг).

Построение калибровочной кривой. В пробирки берут 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл рабочего стандартного раствора и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой. Все остальные операции выполняют в том же порядке, как описано выше.

Расчет проводят по формуле:

$$X = (P \times 100) : (0{,}3 \times 1000),$$ где

P — количество пировиноградной кислоты в мкг, найденное по калибровочной кривой;

0,3 — количество крови, взятое на анализ.

Диагностическое значение. В крови молодняка и взрослой птицы при уровне тиамина в печени не ниже 1,7 мкг/г содержится 1,5—2,5 мг% пировиноградной кислоты. В начальной стадии гиповитаминоза количество ее увеличивается до 3,5—4,5 мг%, что соответствует 0,9—1,1 мкг/г тиамина в печени. Для получения объективных данных необходимо исследовать не менее 10 голов из каждой возрастной группы.

Диагностика гиповитаминоза B_2. Диагноз ставят на основании патологоморфологических изменений и биохимических исследований.

Патологоанатомические изменения

У молодых птиц обнаруживают дерматиты в области головы, шеи, спины, а также скрючивание пальцев и васкуляризацию роговицы — «кровянистый глаз».

У взрослых птиц обнаруживается гипертрофия и размягчение плечевого и седалищного нервов и их утолщение в 3—5 раз.

Лабораторная диагностика. В организме животных витамин B_2 находится в виде рибофлавина, флавин-мононуклеотида и флавеаденин-динуклеотида, которые при суммарном их определении рассматриваются как общий рибофлавин.

ДИАГНОСТИКА B_2-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО СОДЕРЖАНИЮ ОБЩЕГО РИБОФЛАВИНА В ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Определение общего рибофлавина основано на его свойстве флюоресцировать после отделения

от белков. Основным депонирующим органом витамина B_2 в организме птиц является печень, в которой его уровень колеблется от 1,5 до 40,0 мкг/г.

Реактивы. 20% и 2%-е растворы трихлоруксусной кислоты, 4-молярный раствор K_2HPO_4 (912 г K_2HPO_4 на 1 л дистиллированной воды), двууглекислый натрий ($NaHCO_3$). Стандартный раствор рибофлавина (0,4 мкг/мл): в мерной колбе на 1 л растворяют 40 мг рибофлавина и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор можно хранить в течение месяца в темном и холодном месте. Рабочий раствор готовят перед употреблением: берут 1 мл основного раствора в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Приборы, посуда и оборудование. Флюорометр, светофильтры для витамина B_2, пробирки из кварцевого стекла, водяная баня, стеклянные колбы и воронки, мерные колбы на 1000 и 100 мл.

Ход определения. 2 г печени растирают с кварцевым песком в фарфоровой ступке и к ним добавляют 8 мл дистиллированной воды. Суспензию переносят в колбу с 10 мл 20%-го раствора ТХУ. После 15-минутной выдержки на кипящей водяной бане содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр. Колбу трижды промывают 2%-м раствором ТХУ по 5 мл. К фильтрату добавляют 5,8 мл 4-молярного раствора K_2HPO_4 и общий объем смеси доводят дистиллированной водой до 50 мл. Определение общего рибофлавина производят на флюорометре параллельно стандартного раствора и испытуемых фильтратов. Сначала измеряют интенсивность флюоресценции и регистрируют показания. Затем в каждую пробирку для гашения флюоресценции добавляют примерно 0,05—0,07 г смеси гидросульфита натрия и двууглекислого натрия и снова измеряют интенсивность флюоресценции. В стандартном растворе флюоресценция должна погаситься полностью. В испытуемых растворах может оставаться небольшая флюоресценция (после 1-3-кратного гашения), которая возникает от посторонних флюоресцирующих примесей.

Содержание общего рибофлавина рассчитываем по формуле:

$$X = \frac{(A-B) \times 0{,}4 \cdot y}{C \times a} = \text{мкг/г, где}$$

A — показания флюорометра для испытуемого раствора при первом определении;
B — показания флюорометра для испытуемого раствора после гашения;
0,4 — содержание рибофлавина в 1 мл стандартного раствора, мкг;
у — общее количество разведенного испытуемого раствора;
а — вес печени в граммах;
С — первичное показание флюорометра для стандартного раствора, содержащего 0,4 мкг/мл B_2 (лучше стрелку флюорометра устанавливать на 20 деление).

Диагностика гиповитаминоза Вс. Осуществляется на основании клинических и гематологических исследований (бледность кожи, депигментация оперения, снижение количества гемоглобина и эритроцитов).

Недостаток фолиевой кислоты отражается на выводимости и развитии эмбрионов, чаще всего встречается сплющивание головы и недоразвитие нижней челюсти.

Наиболее важное диагностическое значение имеет определение запасов фолиевой кислоты в печени птиц.

Лабораторная диагностика.

ДИАГНОСТИКА Вс-ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ФОЛИЕВОЙ КИСЛОТЫ В ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Основан на принципе окисления фолиевой кислоты марганцевокислым калием в кислой среде. При этом образуется птеридин-6-карбоновая кислота — сильно флюоресцирующее вещество, содержание которого определяется (при pH 4,0—4,5) с помощью флюорометра.

Реактивы. Анилин свежеперегнанный, активированный уголь марки СТ, навеску угля заливаем водным раствором свежеперегнанного анилина и кипятим 1 час при помешивании. Затем уголь отфильтровывают 5—6 раз через воронку Бюхнера с бумажным фильтром с помощью вакуумного насоса, промывают дистиллированной водой и сушат в термостате при температуре 37°С. Стандартный раствор фолиевой кислоты (2 мг фолиевой кислоты на 100 мл дистиллирован-

ной воды, хранить под слоем толуола в темной склянке на холоде. 3%-й раствор аммиака в 70%-м этиловом спирте. 25%-я уксусная кислота. 4%-й $KMnO_4$. 3%-я перекись водорода. 40%-я метафосфорная кислота.

Посуда и оборудование. Вакуумный насос, термостат, водяная баня, флюорометр, фарфоровые ступки, воронки, фильтры Шотта № 3, мерные цилиндры на 50 и 100 мл, воронки Бюхнера, плоскодонные колбы на 100 и 250 мл.

Ход определения. Исследованию подлежит печень от 4—5 кур, имевших характерные для группы показатели (вес, здоровье, продуктивность). Для исследования пригодна печень, хранившаяся в замороженном состоянии (1—5°) не более 2 суток или при температуре +10° +15° — не более 2 часов.

2 г печени тщательно растирают в ступке с кварцевым песком, переносят в колбу на 250 мл, заливают 75 мл 40%-й метафосфорной кислоты и выдерживают на кипящей водяной бане 45 мин. Затем охлаждают, доводят объем до 100 мл и фильтруют. Для дальнейшей работы берут 50—70 мл фильтрата с точным учетом объема. Для адсорбции фолиевой кислоты добавляют к фильтрату 100 мг предварительно подготовленного активированного угля, кипятят 5 мин при помешивании и отфильтровывают под вакуумом на фильтре Шотта № 3. Уголь 5 раз промывают на том же фильтре Шотта № 3 горячим (60—70°) 30%-м раствором аммиака. Общее количество раствора аммиака 70 мл. Из них на первую колбу берут 20 мл, на вторую и третью — по 15 мл, на четвертую и пятую — по 10 мл. Все порции фильтрата соединяют в цилиндре и их выпаривают на водяной бане примерно 10—15 мл, а оставшуюся часть охлаждают. Затем доводят до pH 3,0 25%-м раствором уксусной кислоты и добавляют по каплям 4%-й раствор $KMnO_4$ до исчезновения розовой окраски. Выдерживают 10 мин, затем добавляют по каплям 3%-й раствор перекиси водорода до обесцвечивания, доводят pH до 4—4,5, замеряют объем, фильтруют и флюорометрируют.

Интенсивность флюоресценции испытуемого образца сравниваем с интенсивностью флюоресценции стандартного раствора фолиевой кислоты.

Рабочий стандартный раствор: 1 мл основного стандартного раствора фолиевой кислоты разводят дистиллированной водой до 10 мл и доводят pH до 4,5 25%-м раствором

уксусной кислоты. Общий объем полученного раствора не должен превышать 10 мл (в 1 мл стандартного раствора содержится 2 мкг фолиевой кислоты). Холостую пробу обрабатывают так же, как и опытную, но без испытуемого образца.

Расчет по формуле:

$$X = \frac{(A-B)\cdot C\cdot E}{a\cdot д} = \text{мкг/г, где}$$

А — показания флюорометра для испытуемого образца;
В — » для холостого опыта;
С — объем вытяжки в мл, идущий на измерение флюоресценции;
Е — содержание фолиевой кислоты в стандартном растворе в мкг в 1 мл (2 мкг);
а — количество печени в г в исследуемой вытяжке;
Д — показания флюорометра для стандартного раствора.

Диагностика гиповитаминоза С. Диагноз ставят на основании клинических и патологоморфологических признаков и биохимического определения аскорбиновой кислоты в печени птиц.

Патологоанатомические изменения

У молодняка птиц они характеризуются геморрагическими явлениями, нарушением роста и явлениями анемии.

Кровоизлияния и кровоподтеки обнаруживаются на кожных покровах, слизистых оболочках, в подкожной клетчатке, в мышцах и в области суставов.

У взрослых птиц наблюдается изменение бедренных и берцовых костей в виде остеопороза.

Лабораторная диагностика

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С В ПЕЧЕНИ

Принцип метода. Метод основан на восстановлении аскорбиновой кислотой трехвалентного железа в двухвалентное и комплексирование последнего 2,2′-дипиридилом.

Реактивы. 5%-й раствор трихлоруксусной кислоты, 85%-я фосфорная кислота, 3%-й водный раствор хлорного железа (готовится через каждые 3 дня на бидистиллированной воде), 1%-й водный раствор 2,2′-дипиридила, (к 0,5 г 2,2′-дипиридила прибавить 4 мл спирта, перенести в мерную колбу на 50 мл и долить бидистиллированной водой до метки). Все реактивы должны быть х. ч.

Посуда и оборудование. Стеклянные колбы на 100 мл, центрифужные пробирки, пипетки на 0,1; 2; 1 мл, ножницы, ФЭК.

Ход определения. К 1 грамму размельченной ножницами печени, помещенной в колбу, добавляют 19 мл охлажденного раствора 5%-й ТХУ, встряхивают в течение 1 минуты, выдерживают 14 мин на холоду (в холодильнике). Часть содержимого колбы (7—8 мл) переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 15 мин при 1500 об/мин. Для анализа берут 1,5 мл надосадочной жидкости, прибавляют 0,1 мл 85%-го раствора ортофосфорной кислоты, 0,1 мл 3%-го хлорного железа, 0,8 мл 2,2′-дипиридила. Содержимое пробирки после каждого добавления реактива тщательно встряхивают и оставляют на 30 мин для проявления окраски. В контроль вместо надосадочной жидкости берут 1,5 мл 5%-й трихлоруксусной кислоты.

По истечении 30 мин пробы центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин и измеряют плотность окраски на ФЭКе при зеленом светофильтре № 5, в кювете 5 мм против контрольной пробы.

Калибровочную кривую строят на основе серии разведений различной концентрации из основного раствора, содержащего 50 мг%-й аскорбиновой кислоты. По 1,5 мл каждого разведения вносят в центрифужные пробирки и прибавляют по 0,1 мл 85%-й ортофосфорной кислоты, 0,8 мл 1%-го 2,2′-дипиридила, 0,1 мл 3%-го хлорного железа, оставляют на 30 мин для проявления окраски в затемненном от света месте. Перед колориметрированием пробирки центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Установлено, что стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки, их необходимо готовить непосредственно перед исследованием.

Содержание витамина С в печени при хранении снижается.

Расчет витамина С ведется по формуле:

$$\text{мг\% АК} = \frac{А \cdot 20 \cdot 100}{1{,}5}$$

А — содержание аскорбиновой кислоты, найденное по калибровочной кривой;
20 — разведение;
100 — коэффициент пересчета в %;
1,5 — мл фильтрата.

ПРОФИЛАКТИКА БОЛЕЗНЕЙ ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Особое место в профилактике болезней витаминной недостаточности отводится оптимальным параметрам микроклимата, условиям содержания и обеспеченности птиц полноценными и качественными кормами как в биологическом, так и санитарном отношении.

От соблюдения этих параметров зависит состояние здоровья птиц, их продуктивность и качество птицеводческой продукции.

Однако получаемые птицеводческими хозяйствами комбикорма не соответствуют определенным требованиям из-за недостатка стабилизированных, сыпучих, легкодозируемых, смешиваемых и равномерно распределяемых в корме биологически активных препаратов, без учета их активности и лабораторного контроля.

Поэтому практика убедила птицеводов в необходимости ввода витаминов в кормовые смеси непосредственно в хозяйствах несмотря на то, что они вносятся в виде витаминно-минерального премикса на комбикормовых предприятиях.

В то же время нормативные добавки витаминов в рационы не всегда равнозначны оптимальной потребности организма птиц в них, так как потребность сельскохозяйственных птиц в отдельных витаминах увеличивается или уменьшается при изменении компонентов рациона, добавления в корма жировых и белковых ингредиентов или лечебных препаратов, обладающих антивитаминным действием, влиянием на птицу стрессоров.

Анализ кормов и рационов — один из основных приемов технологического контроля полноценности кормления. Здесь должна учитываться фактическая их питательность, энергопротеиновое отношение и обеспеченность биологически активными веществами (витамины, микро- и макроэлементы). Обогащение рационов добавками витаминов непосредственно в хозяйствах должно осуществляться в соответствии с физиологической потребностью птиц и по результатам биохимических исследований содержания витаминов в депонирующем органе.

При доработке кормов в хозяйствах необходимо соблюдать следующие требования:

а) количество добавляемого в рацион того или иного витамина не должно превышать суточную потребность;

б) обязательная эмульгация жирорастворимых витаминов и растворение в воде витаминов группы В, равномерное смешивание их с наполнителем и остальным кормом;

в) кормовые смеси, обогащенные нестабилизированными жирорастворимыми витаминами должны скармливаться в летнее время не позже 24 часов, а в зимнее — не более 36—48 часов.

В тех хозяйствах, в которых наряду с витаминами добавляются сернокислые соли микроэлементов, их скармливание необходимо производить раздельно. Для этих целей предлагается следующая технология их ввода в корма: по четным числам вводится витаминный премикс, а по нечетным минеральный или наоборот. В результате такого подхода в доработке кормов снижается в 2 раза расход витаминов и микроэлементов, уменьшается нагрузка на организм птиц и повышается резистентность, жизнеспособность и продуктивность птиц.

В профилактике болезней витаминной недостаточности немаловажное значение занимает обеспеченность птиц, особенно родительского стада, качественной травяной мукой и комбинированным силосом.

Использование комбинированного силоса (травяная мука, измельченная морковь или тыква) в кормлении мясных птиц родительского стада (утки, индейки, гуси) полностью профилактирует болезни витаминной недостаточности, повышает биологическую полноценность инкубационного яйца, увеличивает сохранность молодняка и сокращает расход на 25—35% зерновой части комбикорма.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА А

Для предупреждения гиповитаминоза А в рацион птицы при комбинированном типе кормления вводят травяную муку хорошего качества (содержание каротина не ниже 100 мкг/г), морковь и силос, а при сухом типе кормления добавляют препараты витамина А (микровит, концентрат витамина А разной активности) и травяную муку.

Нормы обогащения рациона сельскохозяйственной птицы стабилизированным витамином А из расчета на тонну корма составляет в нашей стране от 7 до 15 млн. ИЕ. Они значительно выше, чем в зарубежных странах с развитым птицеводством и даются с учетом на возможные стрессовые ситуации.

Высокие дозы витамина А в рационе птиц, превышающие физиологические в 2—3 раза, ингибируют обмен витаминов Е и К, ослабляют всасывание каротиноидов, замедляют рост и развитие молодняка птиц.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА Е

При дефиците витамина Е в организме птиц развиваются необратимые изменения в жизненно важных органах (головной мозг, миокард, печень), поэтому основой борьбы с этим нарушением обмена веществ могут быть лишь профилактические мероприятия.

Нормы добавки витамина Е в рационы сельскохозяйственных птиц составляют от 5 до 30 граммов на тонну корма.

Предупреждение болезней Е-витаминной недостаточности осуществляется путем соблюдения требований технологии кормления и содержания, выполнения комплекса ветеринарно-санитарных и зоотехнических мероприятий и, в первую очередь, обеспечения полноценного кормления птиц родительского стада и молодняка 1-60-дневного возраста по рационам, соответствующим возрасту, продуктивной направленности птиц и обеспеченных в оптимальных количествах питательными и биологически активными веществами.

Для сохранения качества отдельных кормовых добавок (жиры и белки животного и растительного происхождения), кормовых смесей и комбикормов в целом необходимо соблюдать требования технологии по их выработке, хранению, качеству и срокам скармливания.

При содержании в жирах, рыбной и мясо-костной муке перекисей липидов, превышающих 0,5% йода и кислотного числа более 20 мг КОН, необходимо вводить запрет на их скармливание молодняку 1-60-дневного возраста и племенной птице.

Хорошим профилактическим действием при Е-гиповитаминозе обладает селенистокислый натрий, добавляемый в корма для сельскохозяйственных птиц, в пределах 1—2 граммов на тонну корма.

Для профилактики экссудативного диатеза у молодняка птиц, наряду с физиологической обеспеченностью токоферолом, дополнительно вводится селенит натрия из расчета 1 грамм препарата на тонну корма с 3 до 60-дневного возраста птиц.

При профилактике беломышечной болезни индюшат, бройлеров и гусят, также добавляется 1 грамм селенита натрия на тонну корма с 3 до 45-дневного возраста птиц.

С целью повышения биологической полноценности инкубационного яйца и предупреждения эмбриональной беломышечной болезни индюшат, наряду с обеспеченностью рациона токоферолом, селенит натрия из расчета 1 грамм препарата на тонну корма вводится индейкам-несушкам и скармливается им на всем протяжении сбора инкубационного яйца.

Для профилактики беломышечной болезни утят, наряду с добавками физиологических норм токоферола, селенит натрия рекомендуется вводить в корма в дозе 1—2 грамма и по следующей схеме: с 3 до 20 дней — 1 грамм препарата, с 21-го по 35-й день — 2 грамма и с 36-го по 50-й день — 1 грамм селенита натрия на тонну корма.

При профилактике энцефаломаляции молодняка птиц препараты селена недостаточно эффективны, здесь, наряду с токоферолом, наиболее эффективным действием обладает сантохин в дозах 125—250 мл на тонну корма с 3 до 60-дневного возраста птиц.

Добавки селенита натрия в кормовые смеси для птиц с целью профилактики болезней Е-витаминной недостаточности полностью вписываются в технологию кормления и в систему ветеринарно-профилактических мероприятий.

Контроль за уровнем токоферола, селена и других метаболитов витаминного обмена в организме птиц осуществляют у птиц родительского стада не реже одного раза в месяц,

а у молодняка 1-60-дневного возраста не менее двух раз в месяц.

Результаты оценки клинического осмотра птицы, морфологических и биохимических исследований органов и тканей птиц, а также данные по качеству кормов, кормовых добавок и инкубационного яйца анализируют и, при соответствующем отклонении от оптимальных параметров, принимают меры по нормализации обмена токоферола.

Контроль за качеством жиров проводят постоянно при поступления в хозяйство, в период хранения и скармливания, но не реже одного раза в месяц.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА К

Предупреждение К-витаминной недостаточности осуществляется за счет введения в рацион птиц витамина К с учетом продуктивной направленности, технологии содержания, соотношения компонентов рациона и других факторов, влияющих на витаминный обмен.

Основными источниками витамина К для птиц являются травяная мука из люцерны, экспарцета, клевера, крапивы. Некоторое количество витамина К содержится в рыбной муке. Добавление в рацион молодняка 2—2,5% люцерновой муки хорошего качества покрывает основную потребность в витамине К.

При увеличении в рационе количества витаминов А и $Д_3$ нарушается обмен витамина К, поэтому его дозы необходимо увеличивать.

В профилактике гиповитаминоза К важное место занимает включение витамина в рацион племенных птиц, так как от запасов витамина К, переданных материнским организмом яйцу, зависит обеспеченность витамином молодняка в первые дни жизни.

Для птиц родительского стада (куры, индейки, утки, гуси) рекомендуются в период яйценоскости добавки в рацион водорастворимого витамина $К_3$-викасола из расчета 4—6 грамм препарата на тонну корма.

Для предупреждения геморрагических явлений у молодняка птиц 3—60-дневного возраста необходимо добавлять в комбикорма витамин $К_3$-викасол из расчета 2—4 грамма на тонну корма. Добавки витамина $К_3$ в корма молодняку

птиц повысят устойчивость их к кокцидиозу и образованию гематом и кровоподтеков в мышечной ткани и в толще кожи.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА Д

Для племенных, яйценоских и мясных кур, индеек, уток, гусей и молодняка рекомендуется вводить в комбикорма витамин $Д_3$ и расчета 1—1,5 млн. ИЕ на тонну корма.

В тех случаях, когда птица находится в условиях технологического стресса, ее потребность в витамине возрастает. При наличии в комбикормах соевого шрота, обладающего рахитогенными свойствами, необходимо увеличивать витамин $Д_3$ в рационе кур-несушек до 2—2,5 млн. ИЕ.

Дозирование витамина должно производиться осторожно, так как витамин обладает определенной токсичностью. Значительное увеличение витамина $Д_3$ в корме приводит к усиленному выведению кальция из костей и депонированию его в мягких тканях.

Большой стресс для молодняка птиц создает неправильная дозировка масляного препарата — тривитамин (А, $Д_3$, Е) ,в 1 мл которого содержится 15000 ИЕ витамина А, 20000 ИЕ витамина $Д_3$ и 10 мг витамина Е.

Во многих птицеводческих хозяйствах этот препарат используют для восполнения дефицита витамина Е и, следовательно, его дозировку рассчитывают по токоферолу, доводя его уровень в рационе до 10—20 г на тонну корма. При этом не учитывают то обстоятельство, что содержание витамина $Д_3$ в рационе птиц произвольно увеличивается в 20—40 раз по сравнению с физиологическими нормами.

Препараты витамина $Д_3$ выпускаются с ограниченным сроком годности, поэтому не подлежат длительному хранению, так как резко теряют свою первоначальную биологическую активность.

Указанный витаминный препарат нельзя использовать в птицеводстве с поправкой на активность.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА $В_1$

Предупреждение тиаминовой недостаточности осуществляется путем включения в рацион витамина $В_1$ в дозах 2—4 грамма на тонну корма.

Для предотвращения тиаминовой недостаточности в ре-

зультате применения антикокцидийных средств (ампролиум и др.) количество витамина B_1 в кормовых смесях для молодняка птиц увеличивается в 2 раза — за 3—4 дня до обработки и 3—4 дня после применения препарата.

Птице, находящейся в условиях действия технологического стресса, главным образом при использовании корма, содержащего высокий уровень микотоксинов, норму тиамина также увеличивают в два раза.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА B_2

При профилактике арибофлавиноза у птиц основное внимание должно уделяться обеспеченности племенных кур витамином B_2, так как от этого зависит не только выводимость, но и запасы витамина в организме цыплят первых дней жизни и, следовательно, их устойчивость к появлению гиповитаминоза B_2.

С профилактической целью птицы должны регулярно получать корма, богатые рибофлавином. Полную потребность птиц в рибофлавине создают за счет введения в рацион 4—6 граммов витамина на тонну корма.

Витамин B_2 быстро разрушается на свету, поэтому его вводят перед употреблением кормосмесей.

При поступлении в организм птиц сульфаниламидных, нитрофурановых препаратов и антибиотиков, а также при стрессовых ситуациях, потребности в рибофлавине для птиц увеличивают в 2 раза.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА Вс

Основное внимание при профилактике фолиевой недостаточности должно быть направлено на полное обеспечение витамином Вс птиц родительского стада и высокое его содержание в инкубационном яйце.

Наиболее богаты фолиевой кислотой дрожжи, люцерновая мука, соевый шрот, в которых содержится витамин в усвояемой форме.

Для профилактики гиповитаминоза рекомендуется вводить в рацион племенных птиц 0,5 грамма фолиевой кислоты на 1 тонну корма. При стрессовых состояниях потребность птиц в фолиевой кислоте увеличивается в 2—3 раза.

Среднее содержание в желтке яиц фолиевой кислоты 0,3—0,35 мкг/г обеспечивает нормальное эмбриональное развитие и жизнеспособность молодняка в первые дни жизни.

ПРОФИЛАКТИКА ГИПОВИТАМИНОЗА С

Аскорбиновая кислота проявляет общее стимулирующее и антитоксическое действие, повышает устойчивость организма птиц к инфекционным заболеваниям. Витамин С является сильнодействующим восстановителем, защищающим от окисления ряд витаминов.

Нормы добавки аскорбиновой кислоты в рационы сельскохозяйственных птиц составляет 50—150 граммов на тонну корма.

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНОВ И СЕЛЕНА У ПТИЦ

Таблица 1

Содержание витамина А в печени молодняка и взрослых кур, уток, индеек и гусей в мкг/г

	куры	утки	индейки	гуси
Суточные	20—25	20—30	25—30	20—25
15-дневные	40—60	45—65	50—60	45—60
30-дневные	70—80	70—90	65—80	75—90
60-дневные	150—200	150—210	150—180	150—190
90-дневные	200—250	200—260	190—240	200—250
150-дневные	300—400	350—400	270—330	300—400
Взрослые	450—550	500—650	350—400	450—550

Таблица 2

Содержание витамина Е в печени молодняка и взрослых кур, уток, индеек и гусей в мг%

	куры	утки	индейки	гуси
Суточные	0,5—0,6	0,6—0,7	0,5—0,6	0,7—0,85
15-дневные	0,7—0,85	0,75—0,85	0,7—0,9	0,9—1,0
30-дневные	0,9—1,0	1,1—1,4	1,6—1,7	1,1—1,2
60-дневные	1,2—1,5	1,8—1,9	1,8—2,3	1,3—1,5
90-дневные	1,8—1,9	1,7—1,85	1,5—1,65	1,6—1,7
150-дневные	1,5—1,8	1,9—2,0	1,75—2,1	1,8—1,9
Взрослые	2,0—2,3	2,2—2,8	2,3—3,0	1,9—2,7

Таблица 3

Содержание витаминов B_1, Е, К, $Д_3$ в крови кур, уток, индеек, гусей (косвенные показатели)

		куры	утки	индейки	гуси
Витамин B_1, мг% (пировиноград. к-та)	молодняк	1,5—2,5	1,5—2,5	1,5—2,2	1,5—1,8
	взрослые	2,0—2,5	2,5—2,7	2,3—2,7	2,0—2,5
Витамин Е, мг% (в сыворотке)	молодняк	0,7—0,8	1,0—1,1	1,3—1,4	1,4—1,5
	взрослые	1,1—1,2	1,1—1,2	1,4—1,5	1,5—1,7
Витамин Е (гемолиз эритроцитов)	молодняк		не более 7—8%		
	взрослые		не выше 8—10%		
Витамин К (протр. вр.)	молодняк		не выше 55 сек.		
	взрослые		не выше 60 сек.		
Витамин $Д_3$, мг% (лим. к-та)	молодняк	4,5—5,5	4,5—5,5	4,5—5,5	4,5—5,5
	взрослые	5,0—6,0	5,0—6,0	5,0—6,0	5,0—6,0

Таблица 4

Содержание витаминов B_1, B_2, Вс, К, С, $Д_3$ в печени молодняка и взрослых кур, уток, индеек и гусей в мкг/г

		куры	утки	индейки	гуси
Вита-	молодняк	1,45—1,9	1,5—1,8	1,4—1,75	1,4—1,8
мин B_1	взрослые	1,4—1,8	1,55—1,9	1,5—1,85	1,5—1,9
Вита-	молодняк	14,5—16,5	15,5—17,5	15—17	15,5—18
мин B_2	взрослые	15—17,5	16,5—18,5	16,5—18,5	16—18,5
Вита-	молодняк	3,5—4,0	4,5—5,5	4,5—5,0	4—5,5
мин Вс	взрослые	3,5—4,5	4—4,5	5,0—5,5	4,5—5,5
Вита-	молодняк	30—50	35—50	35—55	30—55
мин К	взрослые	200—250	220—270	200—240	220—265
Вита-	молодняк	14—28	14—28	14—28	14—28
мин С	взрослые	28—40	28—40	28—40	28—40
Вита-	молодняк	4,5—7,5	4,0—6,5	4,0—6,0	4,5—6,5
мин $Д_3$	взрослые	13—18	12—16	11,5—15,5	13,5—18

Таблица 5

Содержание витаминов А, B_2, Е, каротина, кислотного числа желтка в племенном яйце кур, индеек, уток, гусей

	куры	утки	индейки	гуси
Витамин А	6—9 мкг/г	8—12 мкг/г	7—10 мкг/г	7—10 мкг/г
Витамин Е	2,7—3,7 мг %	2,8—3,9 мг %	3,8—4,9 мг %	5,5—6,5 мг %
Витамин B_2	4—5 мкг/г	5—6 мкг/г	4—5 мкг/г	5—6 мкг/г
Сумма каротиноидов	15—20 мкг/г	15—20 мкг/г	20—25 мкг/г	15—25 мкг/г
Кислотное число желтка	5—5,5 мг КОН	5—6 мг КОН	5—6 мг КОН	5—5,5 мг КОН

Таблица 6

Содержание селена в печени птиц в мкг/г

	куры	утки	индейки	гуси
Молодняк	0,48—0,55	0,45—0,6	0,59—0,65	0,44—0,52
Взрослые	0,5—0,58	0,55—0,67	0,65—0,75	0,47—0,59

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЙ ВИТАМИНА А В МАСЛЯНОМ ПРЕПАРАТЕ

Метод основан на гидролизе исследуемого образца спиртовым раствором щелочи и отделении неомыляющейся фракции эфиром и дальнейшем спектрофотометрировании.

Реактивы. 1. Этиловый эфир. 2. 50%-й водный раствор КОН. 3. Серный эфир. 4. Сернокислый натрий безводный. 5. Дистиллированная вода.

Посуда и оборудование. 1. Колбы со шлифом на 100 мл. 2. Обратные холодильники. 3. Делительные воронки на 250 мл. 4. Мерные колбы на 250 мл и на 100 мл. 5. Водяная баня. 6. Спектрофотометр.

Ход определения. К точной навеске масляного препарата (1 г витамина А) приливают 15 мл этилового спирта и 3 мл 50%-го водного раствора КОН. Смесь омыляют на водяной бане при температуре кипения с обратным холодильником в течение 1/2 часа. К охлажденному раствору приливают двойной объем воды и неомыляемую фракцию экстрагируют в делительную воронку порциями эфира по 50 мл (2 раза) и по 30 мл (2 раза). Эфирные экстракты соединяют, промывают водой до нейтральной реакции (от щелочи). Среду промывных вод определяют по универсальному индикатору. Эфирные вытяжки фильтруют через бумажный фильтр с хорошо прокаленным безводным сернокислым натрием (8 г). Оставшийся на фильтре сульфат натрия промывают 5, 6 порциями эфира по 6 мл. Фильтрат количественно перенося в мерную колбу на 250 мл, доводят объем до метки эфиром. Затем берут 1 мл фильтрата и доводят до 100 мл эфиром.

После этого эфирные вытяжки спектрофотометрируют при

длине волны 326 нм. При зашкаливании прибора фильтрат разбавляют, разведение учитывают.

Расчет ведется по формуле:

$$X = \frac{Д \cdot у \cdot 1830}{Н \cdot 100} = ИЕ/г, \text{ где}$$

Д — оптическая плотность;
у — степень разведения;
Н — навеска в граммах;
1830 — коэффициент.

Для витамина А 1 ИЕ = 0,3 мкг.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ СЕЛЕНА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Принцип метода. Четырехвалентный селен вступает в реакцию с 2,3-диаминонафталином, образуя соединение — 4,5-бензопиазоселенол. Это соединение флюоресцирует под действием ультрафиолетовых лучей.

Оборудование, материалы и реактивы:

Аммиак 25%-й водный раствор, азотная кислота, 1%-й раствор гидроксиламина солянокислого, 0,1% раствор 2,3-диаминонафталин (ДАН) марки «флука» (ФРГ), индикаторная бумага универсальная, пергидроль 30%, 0,1 н. и 50%-е растворы соляной кислоты, стандартные растворы селена металлического ВТУ-341-60; 0,1М раствор трилона «Б», хлорная кислота, раствор хлорной кислоты 1 : 100, гексан, воронки стеклянные, воронки делительные емкостью 100 м, водяная баня, колбы мерные на 50, 100 мл, пипетки стеклянные мерные.

Приготовление некоторых реактивов. Очистка диаминонафталина (ДАН): 1 г диаминонафталина растворить в 50 мл этилового спирта (ректификат) в присутствии 2 г активированного угля при нагревании. После полного растворения фильтруют через теплую фильтровальную бумагу в теплой воронке. Затем раствор охлаждают и фильтруют через холодную фильтровальную бумагу в холодной воронке. Полученные на фильтровальной бумаге кристаллы растворяют в 50%-м растворе этилового спирта, раствор охлаждают и фильтруют через холодную фильтровальную бумагу в холодной воронке. Полученные кристаллы хранят в холодильнике. Приготовление 0,1%-го раствора 2,3-диаминонафталина: 100 мг очищенного реактива залить 100 мл 0,1 н раствором соляной

кислоты. Растворять при нагревании на водяной бане при 80°С в течение 20 минут. Раствор профильтровать через фильтр «белая полоса» и проэкстрагировать гексаном дважды, используя по 15—20 мл гексана в течение 2 минут. Реагент отфильтровать в склянку из темного стекла, гексан выбрасывают.

Приготовление стандартных растворов селена

Раствор селена А: 100 мг металлического селена, растертого в порошок, растворяют в 10 мл азотной кислоты уд. веса 1,4, сначала на холоде при помешивании, а затем при нагревании. После полного растворения смывают стенки стакана водой, раствор упаривают на водяной бане до влажных солей. Полученную селенистую кислоту растворяют в воде, раствор переносят в мерную колбу на литр, прибавляют 5—10 мл соляной кислоты и раствор доводят до метки. Раствор А содержит в 1 мл 100 мкг селена (срок хранения—1 год).

Раствор селена Б: 10 мл раствора А помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют несколько капель хлорной кислоты, доливают водой до метки и перемешивают. Раствор Б содержит в 1 мл 10 мкг селена (раствор можно использовать в течение недели).

Раствор селена В: 1 мл раствора Б помещают в мерную колбу на 100 мл, прибавляют несколько капель хлорной кислоты, доливают водой до метки и перемешивают. Раствор В содержит в 1 мл 0,1 мкг селена. Раствор В готовят свежим для каждой серии опытов.

Ход анализа. Разрушение испытуемого образца ведут смесью кислот в соотношении 2:1 азотной и хлорной. Для предупреждения потерь селена разрушение ведут в колбочках с воздушным холодильником. Разрушение следует вести в присутствии избытка азотной кислоты, так как в восстановительных условиях заметны потери селена.

0,250 — 1 г образца заливают 10 мл азотной кислоты и оставляют на ночь 12—18 часов. Разложение образцов ведут на электроплитках, а затем приливают в колбочки 5 мл хлорной кислоты и продолжают осторожно нагревать на плитке, избегая сильного разогревания, т. к. возможно разбрызгивание. Если при появлении паров хлорной кислоты (тяжелые белые пары) вещество разложилось не полностью, то еще добавляют 2—3 мл азотной кислоты и продолжают нагревание до пол-

ного обесцвечивания образца. После полного разложения материала и просветления испытуемого раствора добавляют несколько капель пергидроля для полного удаления азотной кислоты. (Если подержать над паром фильтровальную бумагу, смоченную в 1,0%-м растворе дифениламина, и она посинеет, значит, раствор содержит азотную кислоту и нужно продолжать выпаривание). После этого к раствору приливают 5 мл воды и снова выпаривают до полного удаления азотной кислоты (нельзя допускать сильного парения хлорной кислоты), так как при этом возможен переход селена четырехвалентного в нереакционноспособный селен шестивалентный.

Флюорометрическое определение селена

В колбу с разрушенным образцом добавляют 20 мл воды и раствор доводят до кипения для растворения осадка. После охлаждения осадок отфильтровывают через фильтр «синяя лента», колбу ополаскивают и сливают на фильтр (ополаскивая этим и фильтр), разведенной (1:100) хлорной кислотой. Фильтр с осадком выбрасывают.

К фильтрату добавляют 2,5 мл 0,1 н трилона Б и устанавливают pH по универсальной индикаторной бумажке (pH=2) путем приливания к фильтрату 25%-го раствора аммиака. Затем добавляют 1 мл 1%-го раствора гидроксиламина, через 5 минут к раствору добавляют реагент ДАН 3—5 мл и ставят на водяную баню при температуре 80° С на 20 мин. Раствор охлаждают в темноте 30—60 минут. После охлаждения раствор переносят в делительную воронку на 100 мл, прибавляют гексана 10 мл и экстрагируют 10 минут на встряхивателе. Органическую фазу фильтруют через фильтр «белая лента» в пробирку с притертой пробкой. Определяют флюоресценцию на флюорометре марки ЭВ-3МА, используя светфильтры ФК-1 (прямой) и B_2 (боковые) с длиной волны 366 нм прямого (возбуждающего) и 520 нм бокового или запирающего светофильтра.

Обработка результатов

Проводят по калибровочному графику, где на оси абсцисс откладывают показания содержания селена в микрограммах, а на оси ординат — показания прибора. Для построения калибровочного графика в колбочки наливают следующее ко-

личество стандартного раствора В (указанное в таблице) и доводят объем до 25 мл 0,1 н раствором соляной кислоты.

Таблица

Количество стандартного раствора	Количество 0,1 н соляной кислоты, мл	Содержание селена, мкг/мл
1. Холостой опыт	до 25	0
2. 0,2 мл	» 25	0,02
3. 0,4 »	» 25	0,04
4. 0,6 »	» 25	0,06
5. 0,8 »	» 25	0,08
6. 1,0 »	» 25	0,1
7. 2,0 »	» 25	0,2
8. 5,0 »	» 25	0,5

Далее эти растворы обрабатывают, как и испытуемые, с момента добавления гидроксиламина.

$$\text{мкг/г} = \frac{а}{н}, \text{ где}$$

а — показания по калибровочному графику (мкг);
н — навеска (г).

Очистка органических растворителей от примесей

Одной из основных операций при химическом определении витаминов является извлечение их из субстрата органическими растворителями — петролейным или этиловым эфиром, бензолом, ацетоном, гексаном и т. д. Однако выпускаемые химической промышленностью вышеперечисленные препараты содержат примеси (перекиси, тиофен и др.), которые либо мешают определению витаминов, либо разрушают их в процессе анализа. В связи с этим перед употреблением органических растворителей в анализах необходимо удалить примеси.

1. Петролейный эфир — промышленность выпускает различные фракции: а) с температурой кипения (т. к.) 30—50°, 40—70°, 70—100°. Для определения витаминов используют

петролейный эфир фракции 40—70°, не содержащий ненасыщенных и ароматических углеводородов. Присутствие ненасыщенных углеводородов в петролейном эфире можно обнаружить по обесцвечиванию разбавленного 2%-го водного раствора перманганата калия ($KMnO_4$). Для этого в пробирку вносят одну каплю раствора $KMnO_4$ и разбавляют водой до розового легко просматриваемого слабого раствора. 2 мл этого раствора переносят в другую пробирку, прибавляют одну каплю петролейного эфира и встряхивают в течение 10—20 сек. Обесцвечивание раствора в течение 1 мин. указывает на наличие ненасыщенных углеводородов. Удаление ненасыщенных углеводородов из петролейного эфира производят следующим образом. К 8—10 объемам эфира в делительную воронку приливают один объем концентрированной серной кислоты (х. ч.) и взбалтывают 10—15 мин. Побуревшую кислоту сливают, приливают новую порцию и очистку продолжают. Обработку эфира серной кислотой повторяют до тех пор, пока не прекратится побурение кислоты. Далее эфир промывают 1—2 раза дистиллированной водой, затем 15—16%-ным раствором едкого натрия (в таком же объеме, как и серная кислота) и вновь водой 4—5 раз до исчезновения реакции на щелочь в промывных водах (по фенолфталеину). Эфир сушат сернокислым натрием и перегоняют при температуре 40—70°.

Перегонку петролейного эфира производят на водяной бане со скрытым электрообогревателем. Первые и последние порции петролейного эфира отбрасывают. Хранят эфир над сернокислым натрием в темной посуде или в темном месте без доступа влаги.

При использовании бензина с температурой кипения 70—90° (определение каротиноидов и бета-каротина), гексана (при тонкослойной хроматографии) очистка от ненасыщенных углеводородов и способ хранения такие же, как и петролейного эфира.

2. Диэтиловый эфир (эфир для наркоза, серный) может содержать перекиси, которые способствуют разрушению витаминов в процессе определения. Поэтому прежде чем приступить к работе с эфиром, необходимо убедиться в отсутствии перекисей.

Наличие перекисей обнаруживают следующим образом: пробу эфира (2—3 мл) встряхивают в пробирке с таким же объемом 2%-го раствора йодистого калия, предварительно

подкисленного несколькими каплями разбавленной соляной кислоты. Появление бурого окрашивания эфирного слоя указывает на присутствие перекисей. Или же к 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50%-го раствора KI и 1%-го спиртового раствора фенолфталеина. Появление красной окраски указывает на присутствие перекисей. При наличии в эфире перекисей их удаляют следующим образом: 1 литр эфира встряхивают 5—10 минут в 2-литровой делительной воронке или колбе со смесью 10 мл 40%-го раствора KOH (или NaOH) и 100 мл 4%-го раствора перманганата калия. После отстаивания раствор перманганата сливают и вновь добавляют такое же количество нового раствора перманганата и очистку повторяют. Обработку эфира повторяют до тех пор, пока окраска вновь добавленного раствора перманганата не перестанет изменяться. Однако и после этого необходимо проверить эфир на отсутствие перекисей, очистку эфира перманганатом необходимо продолжить. При отсутствии перекисей эфир промывают несколько раз дистиллированной водой до нейтральной реакции промывных вод на фенолфталеин. Очищенный эфир сушат безводным сернокислым натрием и перегоняют при 40° на водяной бане с закрытым электрообогревом. Приготовленный таким образом диэтиловый эфир годен для употребления. Хранят эфир над сернокислым натрием в темной посуде с притертой пробкой или в защищенном от света месте.

3. Хлороформ перед употреблением в анализах промывают 5—6-кратным дистиллированной водой в соотношении 2 : 1, высушивают над безводным сернокислым натрием. Высушенный хлороформ перегоняют при температуре 40° и хранят над безводным сернокислым натрием в темной посуде с притертой пробкой, в темноте, чтобы предотвратить образование фосгена (фотохимическое). По этой же причине рекомендуется все операции с очисткой хлороформа проводить в затемненном помещении или в темной посуде.

4. Бензол может содержать незначительное количество тиофена (иногда около 0,05%), для удаления которого используют серную кислоту. Присутствие тиофена обнаруживают следующим образом: берут 10 мл изатина и растворяют в 10 мл серной кислоты, затем 3 мл бензола встряхивают с этим раствором и оставляют стоять 15—20 минут.

Окрашивание кислотного слоя в сине-зеленый цвет указывает на наличие тиофена.

Процедура очистки от тиофена сводится к следующему: бензол (2 л) наливают в колбу или делительную воронку, туда же добавляют концентрированную кислоту в количестве 10% от объема бензола (200 мл) весь состав тщательно встряхивают (лучше на механической качалке) в течение 20—30 минут. Затем дают смеси отстояться и нижний кислотный слой сливают. Обработку серной кислотой продолжают до тех пор пока она не будет оставаться бесцветной или слабо желтой, а проба на тиофен — отрицательной. Очищенный от тиофена бензол 2—3 раза промывают дистиллированной водой для удаления остатков кислоты, затем обрабатывают 10%-м раствором щелочи (KOH или NaOH), снова водой до нейтральной реакции промывных вод с фенолфталеином и сушат безводным сернокислым натрием. После фильтрования бензол помещают в круглодонную колбу и перегоняют при температуре 80°С. Перегонку производят на электрической водяной бане или плитке с закрытым электрическим обогревом. При перегонке бензола возможна его кристаллизация в трубке холодильника, если последняя омывается очень холодной водой (4—5°), что может привести к разрыву колбы вследствие скопления паров. Поэтому при перегонке бензола, а также других органических растворителей не следует оставлять перегонный аппарат без присмотра. Хранят бензол в темной посуде (или темном месте) с притертой пробкой над безводным сернокислым натрием.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
1. Общие вопросы	3
2. Причины, обуславливающие гиповитаминозы . . .	3
3. Диагностика гиповитаминозов А, Е, К, $Д_3$, B_1, B_2, Вс, С	4
4. Профилактика болезней витаминной недостаточности	33
5. Физиологические параметры содержания витаминов и селена у птиц	40
6. Методика определения витамина А в масляном препарате	43
7. Методика определения содержания селена в биологических объектах	44
8. Очистка органических растворителей от примесей . .	47

Коллектив авторов

СИСТЕМА МЕРОПРИЯТИЙ ПО БОРЬБЕ С БОЛЕЗНЯМИ ВИТАМИННОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ В ПРОМЫШЛЕННОМ ПТИЦЕВОДСТВЕ

Ответственный за выпуск В. Т. Самохин
Редактор О. М. Зайцева

Сдано в набор 27/XI-89. Подписано в печать 10/I-90.
Формат бумаги 60×90 1/16. Объем 3,25 п. л. Уч.-изд. л. 1,7.
Тираж 3000 экз. Заказ 4097.

Воронежская типогр. «Транспорт» Управления издательств, полиграфии и книжной торговли

gost.e-ecolog.ru