

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ

**Факультет ветеринарной медицины и технологии
животноводства**

Кафедра частной зоотехнии

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Методические указания

для лабораторных и самостоятельных работ

для обучающихся очной и заочной форм обучения по специальности

36.05.01 – Ветеринария и направлению подготовки

36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

ВОРОНЕЖ

2020

Методические указания рассмотрены и рекомендованы к утверждению на заседании кафедры частной зоотехнии «19» 11 2019 г. Протокол № 6.

Утверждены методической комиссией факультета ветеринарной медицины и технологии животноводства «21» 11 2019 г. Протокол № 4.

Составители: доцент, кандидат биологических наук И.Ю. Венцова; профессор, доктор биологических наук Сафонов В.А.

Рецензент: доцент кафедры акушерства, анатомии и хирургии, кандидат ветеринарных наук, доцент А.А.Курдюков.

1. ВВЕДЕНИЕ

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

1.2. Использование унифицированных методов обеспечивает стандартизации проводимых исследований в ветеринарных лабораториях, а получение сравнимых результатов.

1.3. 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.

1.4. 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

2.1. Пробирки для отбора проб крови ветеринарные специалисты хозяйств получают в ветеринарной лаборатории: на каждое животное по 2 биологических пробирки (№1 и №2, объемом не менее 20 мл) и по 2 центрифужных (№3 и № 4, объем 11-12 мл).

2.1.1. В пробирку №1 для получения цельной крови и плазмы сотрудники ветеринарных лабораторий предварительно вносят, по 3 капли 1%-ного раствора гепарина на каждые 15-20 мл крови.

2.1.2. В случаях, когда содержание натрия в плазме крови не определяется, вместо гепарина можно использовать лимоннокислый или щавелевокислый натрий по 15-20 мг на каждые 15-20 мл на каждые 15-20 мл крови.

2.1.3. Пробирка №2 остается сухой для получения сыворотки.

2.1.4. В одну из центрифужных пробирок (№ 3) вносят 0,5 мл вазелинового масла и каплю 1%-ного раствора гепарина, в другую (№ 4 - градуированную) - 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ).

2.1.5. Все пробирки закрываются резиновыми пробками. Пробирка №4 помещается в термос со льдом.

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

2.3. Кровь набирают в пробирки №1, №2 и №3 по стенке во избежание гемолиза.

2.3.1. Кровь в пробирках №1 и №3 осторожно перемешивают путем 3-кратного перевертывания пробирок.

2.3.2. В градуированную пробирку № 4 с раствором ТХУ приливают из пробирки №1 5 мл крови (до отметки 10 мл) и тщательно перемешивают стеклянной палочкой.

2.3.3. Пробирки № 1, 3 и 4 ставят в термос со льдом, пробирку № 2 транспортируют летом обычным путем, а зимой – предохраняют от замерзания.

2.4. В лаборатории кровь в пробирка №2 обводят тонкой спицей из нержавеющей стали диаметром 1,0-1,5 мм и ставят в термостат при температуре 37-38° для окончательного отделения сыворотки.

2. 4.1. Отделившуюся сыворотку вливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20-30 мин. при 2000-3000 об/мин.

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

2.5. Для получения плазмы кровь в пробирках с антикоагулянтом (№1) осторожно перемешивают, наливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 20-30 мин. при 2000-3000 об/мин. Плазму переносят в другие пробирки, а хранят в холодильнике.

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

2.6. В цельной крови из пробирки №1 определяют гематокрит, кетоновые тела, медь, цинк, кобаль, 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 (щелочкой резерв).

2.8. Смесь крови и ТХУ в пробирке №4 центрифугируют в течении 20-30 мин. при 2000-3000 об/мин. Верхний слой (безбелковый фильтрат) сливают в другую пробирку и в ней определяют глюкозу, неорганический фосфор в неорганический маг-

ний. Безбелковый фильтрат крови хранят в холодильнике не более 5 дней.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО БЕЛКА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

3.1. Принцип метода

Содержание белка определяют по рефракции сыворотки крови.

3.2. Реактивы 3.2.1. Смесь этилового спирта с серным эфиром 1:1.

3.2.2. Дистиллированная вода.

3.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

3.3.1. Спирт этиловый 96%-ный - 50 мл.

3.3.2. Эфир серный (для наркоза) - 50 мл.

3.4. Специальное оборудование и аппаратура

3.4.1. Рефрактометр типа (ПНР) РДУ, ИРФ - 454, УРЛ и др.

3.4.2. Холодильник бытовой, поддерживающий температуру 4-6°C.

3.4.3. Термометр на 50°C.

3.4.4. Термостат, поддерживающий температуру

33±1°C. 3.4.5. Стеклянная палочка.

3.4.6. Марлевые салфетки.

3.4.7. Вата.

3.4.8. Стаканчика.

3.4.9. Пробирки биологические.

3.4.10. Пробирки центрифужные.

3.4.11. Центрифуга.

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

3.6. Ход определения

3.6.1. Стеклопалочкой на призму рефрактометра наносят каплю дистиллированной воды и закрывают камеру.

3.6.2. Проводят подготовку прибора к работе: регулировочным винтом устанавливают шкалу рефрактометра на отмотку 1,3330.

3.6.3. Удаляют воду с призмы марлевой салфеткой, и протирает ватой, смоченной смесью этилового спирта с эфиром.

3.6.4. Наносят каплю, сыворотки крови на призму стеклянной палочкой, закрывают камеру и 2 раза производят отсчет. 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, а обсушивают марлей.

3.7. Расчеты результатов

3.7.1. Содержание белка в исследуемых пробах (в %) определяют по таблице 1.

3.7.2. Если температура в камере во время отсчёта не соответствует 20°C, 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 $\pm 1\%$.

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.

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

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

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

Таблица 1
 Содержание белка в сыворотке крови в зависимости от
 коэффициента рефракции

Показания рефрактометра	Белок	Показания рефрактометра	Белок	Показания рефракто- метра	Белок
1.3450	5.25	1.3480	7.00	1.3510	8.74
1.3451	5.31	1.3481	7.05	1.3511	8.80
1.3452	5.37	1.3482	7.11	1.3512	8.86
1.3453	5.43	1.3463	7.17	1.3513	8.91
1.3454	5.48	1.3484	7.23	1.3514	8.97
1.3455	5.54	1.3435	7.29	1.3515	9.03
1.3456	5.60	1.3406	7.34	1.3516	9.09
1.3457	5.66	1.3487	7.40	1.3517	9.15
1.3458	5.72	1.3468	7.46	1.3518	9.20
1.3459	5.77	1.3439	7.52	1.3519	9.26
1.3460	5.83	1.3490	7.58	1.3520	9.32
1.3461	5.89	1.3491	7.63	1.3521	9.38
1.3462	5.95	1.3402	7.69	1.3522	3.44
1.3463	6.01	1.3493	7.75	1.3523	9.50
1.3464	6.07	1.3494	7.81	1.3524	9.55
1.3465	6.12	1.3495	7.87	1.3525	9.61
1.3466	6.18	1.3496	7.93	1.3526	9.67
1.3467	6.24	1.3497	7.98	1.3527	9.73

1.3458	6.30	1.3498	8.04	1.3528	9.79
1.3469	5.36	1.3499	8.10	1.3529	9.84
1.3470	6.41	1.3500	8.16	1.3530	9.90
1.3471	6.47	1.3501	8.22	1.3531	9.96
1.3472	6.53	1.3502	8.27	1.3532	10.02
1.3473	6.59	1.3503	8.33	1.3533	10.08
1.3474	6.65	1.3504	8.39	1.3534	10.13
1.3475	6.70	1.3505	8.46	1.3535	10.19
1.3476	6.76	1.3506	8.51	1.3536	10.25
1.3477	6.82	1,3507	8.57	1.3537	10.31
1.3476	6.88	1.3503	8.62	1.3538	10.37
1.3479	6.94	1.3509	8.66	1.3539	10.43

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ФРАКЦИЙ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ НЕФЕЛОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

5.1. Принцип метода.

Отдельные, фракции белка способны осаждаться фосфатными растворами определенной концентрации.

5.2. Реактивы

5.2.1. 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 100 мл: 92,4 мл (№ 1), 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 1 капле хлороформа на 100мл раствора.

5.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

5.3.1. Натр едкий, хч - 100 г.

5.3.2. Калий фосфорнокислый однозамещенный, х.ч, ч.д.а - 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.

Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови (п.п. 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 перевертывания ее 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. Расчет результатов

5.7.1. Расчет производится по схеме;

ОП пробирка № 1 - ОП пробирка № 2 = ОП альбуминов.

ОП пробирка № 2 - ОП пробирка № 3 = ОП α – глобулинов.

ОП пробирка № 3 - ОП пробирка № 4 = ОП β – глобулинов.

ОП пробирка № 4 – ОП γ – глобулинов.

Принимая сумму ОП альбуминов и всех глобулиновых фракций за 100%, вычисляют содержание каждой фракции в

относительных процентах. Зная концентрацию общего белка можно произвести расчет в абсолютные величины.

5.7.2. Пример расчета:

ОП пробирка №1 = 0,800; ОП пробирка №2 = 0,400;

ОП пробирка №3 = 0,300; ОП пробирка №4 = 0,200;

тогда ОП альбуминов = $0,800 - 0,400 = 0,400$; ОП α

– глобулинов = $0,400 - 0,300 = 0,100$; ОП β –

глобулинов = $0,300 - 0,200 = 0,100$; ОП γ –

глобулинов = 0,200;

относительный % альбуминов = $0,400 * 100 / 0,800 = 50\%$

α – глобулинов = $0,100 * 100 / 0,800 = 12,5\%$

β – глобулинов = $0,100 * 100 / 0,800 = 12,5\%$

γ – глобулинов = $0,200 * 100 / 0,800 = 25\%$

5.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 74%.

5.9. Время необходимое для проведения исследования:

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

5.10. Физиологические пределы

5.10.1. Определение балловых фракций позволяет провести дифференциацию отдельных видов гипо- а гиперпротеинемии, а также выявить профиль белковых фракций сыворотка крови при ряде заболеваний и состояний, на сопровождающихся изменениями общего содержания белка.

5.10.2. Снижение альбуминов наблюдается при острых воспалительных процессам, поздних стадиях пневмоний, нефрозах и нефритах, токсикозах беременности, злокачественных новообразованиях кроветворного и лимфоидного аппарата, при гепатитах, циррозах печени.

5.10.3. 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 обуславливают диспротеинемии, выражением которой является белковый коэффициент (отношение между количеством альбуминов и суммой глобулинов). В норме оно составляет 0,9 - 1,4.

5.11. Источники литературы

5.11.1. Вургафт К.И. из практика применения экспресс - метода определения белковых фракций сыворотки крови. - Лаб. дело, 1973, №12 751-752.

5.11.2. Карпюк С.А. Определение белковых фракций сыворотки крови экспресс - методом. - Лаб. дело, 1962, №7, с. 33-36.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ДИАЦЕТИЛМОНООКСИМОМ

6.1. Принцип метода Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиокарбазида 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 150 анализов.

6.2.1. Основной раствор реагента. Именуемое в наборе таблетку, содержащую диацетилмонооксим, тиосемикарбазид и соль железа растворяют в 30 мл дистиллированной воды при умеренно 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 150 мл дистиллированной воды, а 25 мл 96%-ной серной кислоты (хч или чда). После охлаждения доводит до метки дистиллированной водой. Устойчив неограниченное время.

6.2.3. Рабочий раствор реагента. Смешивают растворы, основного реагента, а серой кислота в соотношении 1:1. 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

6.3.1. Водяная баня.

6.3.2. Пипетки на 0,1; 1,0 и 2,0 мл.

6.3.3. Мерные колбы на 50 и 250 мл.

6.3.4. Стеклянные палочки.

6.3.5. Алюминиевая фольга.

6.3.6. Пробирки химические.

6.4. Материал для исследования

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

6.5. Ход определения

6.5.1. Для осаждения белка к 2 мл 5%-ного раствора ТХУ прибавляют 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 15-20 мин. при 2000-3000 об/мин.

6.5.2. К 0,6 мл надосадочной жидкости приливают 2,5 мл рабочего раствора реагента, и перемешивают.

6.5.3. Пробирки закрывают резиновыми пробками, обернутыми алюминиевой фольгой и нагревают на кипящей 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 (2,5 мл рабочего раствора реагента и 0,6 мл 5%-ного раствора ТХУ), обработанного аналогичный образец. Измерение проводят в кювете, толщиной слоя 0,5 см при длине волны 525 нм (светофильтр № 6) на позднее, чем через 15 мин. после охлаждения. Окраска неустойчива.

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

6.6. Расчета результатов

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

$$C \text{ мг\%} = A/B \times 25$$

6.7. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $\pm 4\%$

6.8. Количество определений в день

В течение рабочего дня один исследователь проводит 100 анализов,

6.9. Физиологические пределы

6.9.1. Содержание мочевины в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице

6.9.2. Повешение мочевины в сыворотке крови наблюдается при белковом перекорме, при дефиците легкопереваримых 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.

6.10. Источника литературы

6.10.1. Инструкция к набору "Биотест мочевины" ЧССР.

6.10.2. Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных, методов исследований, М., 1973. 66-69.

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

7.1. Принцип метода

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

7.2. Реактивы

7.2.1. Орто-толуидин (ч)-желтого цвета, обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при 200°C (на песочной бане).

Свежеприготовленный орто-толуидин должен быть бесцветным или слабо-желтого цвета. Экстинкция 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. Тиомочевана, 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, нагревает на водяной бане.

7.2.6. Орто-толуидиновый реактив. В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,16 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 +100°C, растворяют в 100 мл 0,2%-ного раствора бензойной кислоты.

7.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

7.3.1. Орто-толуидин, ч - 30 мл.

7.3.2. Ледяная уксусная кислота, хч - 470 мл.

7.3.3. Трихлоруксусная кислота, чда - 100 г.

7.3.4. Тиомочевина, чда - 1 г.

7.3.5. Глюкоза, ч - 0,1 г.

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

7.4. Специальное оборудование и аксессуары.

7.4.1. ФЭК-66 или др.

7.4.2. Сушильный шкаф.

7.4.3. Колба-реторта.

7.4.4. Песочная баня.

7.4.5. Колбы мерные на 100 мл.

7.4.6. Лабораторный автотрансформатор.

7.4.7. Центрифуга.

7.4.8. Водяная баня.

7.4.9. Пробирки химические.

7.4.10. Пробирки центрифужные.

7.4.11. Термометр лабораторный на 150°C.

7.4.12. Штативы для пробирок.

7.4.13. Холодильник бытовой.

7.4.14. 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

7.6.1. В пробирку вносят 0,2 мл безбелкового фильтрата крови, 0,3 мл дистиллированной воды, а 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 контроле при длине волны 590-555 нм, в кювете толщиной 10 мм.

7.6.4. В контрольную пробирку вносят 0,1 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 0,1 мл глюкозы с концентрацией 50 мг/%, 0,1 мл 20%-ного раствора ТХУ, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива.

7.7. Расчеты результатов проводят по формуле;

$C_{оп} = C_{ст} * E_{оп} / E_{ст}$, где

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

$C_{от}$ - концентрация гдгкозы а стандарта , мг/%;

$E_{оп}$ - оптическая плотность пробы;

$E_{ст}$ - оптическая плотность стандарта.

7.8. Ошибка метода составляет $\pm 2,5\%$.

7.9. Количество определений в день.

В течение рабочего дня один исследователь производит 60 определений.

7.10. Физиологические пределы

7.10.1. Содержание глюкозы в крови животного представлено в таблице 2,

7.10.2. Снижение глюкозы в крови (гипогликемия) бывает при недостаточности микроэлементов в организма, легкоусвояемых углеводов в рациона, при кетозе, остеодистрофии, ацидозе, гипокинезии.

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

7.11. Источники литературы

7.11.1. Масленников В. Д., Михеева А, И. Лабораторное дело, 1970, 10, 588.

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ ПО МЕТОДУ СОМОДЖИ

8.1. Принцип метода

Метод основан на окислении глюкозы в щёлочной среде при кипячении с серноокислой медью. При йодометрическом определении образовавшийся закись меди окисляется йодом. Последний освобождается подкислением определённого количества йодноватокислого калия, а оставшийся свободный йод оттитровывается гипосульфатом.

8.2 Реактивы

8.2.1. 5%-ный раствор серноокислого цинка. Берут 5 г серноокислого цинка, 7-водного и растворяют в 95 мл дистиллированной воды.

8.2.2. 0.3. н. раствор едкого натра. Берут 12 г едкого натра (чда, хч) и растворяют в 700 мл дистиллированной воды, охлаждают и водой доводят раствор в мерной колбе до 1 л. Растворы 8.2.1. и 8.2.2. должны нейтрализовать друг друга объём в объём. Последнее проверяется медленным титрованием с индикатором фенолфталеином.

8.2.3. Реактив Сомоджи.

- а) медь серноокислая, 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 серноокислый безводный, чда, хч - 180 г;
- е) натр едкий, хч, 1 в. раствор - 40 мл;

ж) калий йодноватокислый 1 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 . Серноокислый натрий растворяют в 500 мл горячей воды и нагревают до кипения. Оба раствора смешивают и добавляют йодистый калий, предварительно растворённый в малом количестве воды. Затем вливают раствор йодноватокислого калия и после охлаждения доливают водой, в мерной колбе до 1 д. Через несколько дней раствор фильтруют. Реактив рекомендуется держать при комнатной температуре, не подвергая его действию солнечного света. Если температура ниже 20°C 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 1 л.

8.2.5. 0,005 н. раствор натрия серноватокислого 5-водного чда, (готовится перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксаля).

8.2.6. 1%-ный раствор крахмала, приготовленный в насыщенном растворе хлористого натрия. 6.2.7. Насыщенный раствор хлористого натрия.

6.2.8. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

8.2.9. Спирт этиловый.

6.2.10. Натрий фтористый.

6.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

8.3.1. Цинк сернокислый, 7-водный, чда - 20 г.

8.3.2. Натр едкий - 20 г.

8.3.3. Спирт этиловый - 100 мл.

8.3.4. Серная кислота, хч, концентрированная (уд. вес 1,84) - 56 мл.

8.3.5. Крахмал растворимый - 1 г.

8.3.6. Натрий хлористый - 100 г.

8.3.7. Фенолфталеин - 1 г.

8.3.8. Медь сернокислая, 5-водная, чда, хч - 4 г.

8.3.9. Натрий углекислый безводный, чда, хч - 15 г.

8.3.10. Калий-натрий виннокислый, 4-водный, чда - 15 г.

8.3.11. Калий йодистый, чда, хч - 2,5 г.

8.3.12. Натрий сернокислый безводный, чда, хч - 90 г.

8.3.13. Калий йодноватокислый фиксаля 0,1 н. - 1 шт.

8.3.14. Натрий фтористый - 5 г.

8.3.15. Натрий серноватокислый, 5-водный ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) натрия тиосульфат, гипосульфит, чда, фиксаля - 1 шт.

8.4. Специальное оборудование и аппаратура

8.4.1. Сахарные пробирка 2,0-2,5x15 см.

8.4.2. Водяная баня.

8.4.3. Микробюретка на 5 мл.

8.4.4. Мерные колбы на 1000 мл.

8.4.5. Колбы из термостойкого стекла на 500 и 1000 мл.

8.4.6. Холодильник бытовой.

8.4.7. Термос на 3-5 л.

8.4.8. Центрифуга.

8.4.9. Штативы для пробирок.

8.4.10. Пробирки химические.

8.5. Материалы для исследования

8.5.1. Материалом служит стабилизированная фтористым натрием кровь.

8.5.2. Осаждение белком. Одна часть крови гемолизируется в пяти частях воды и смешивается с двумя частями 0,3 н. раствора едкого натра, двумя мл частями 5%-ного раствора сернокислого цинка. Тщательно перемешивают и через 30 мин. центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 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. Кровь необходимо по возможности быстрее доставлять в термосе со льдом в лабораторию, где получают безбелковый фильтрат, который может храниться в холодильнике не более 5 дней.

8.6. Ход определения

8.6.1. В пробирку для анализа берут 5 г/л прозрачного безбелкового фильтрата крови и 5 мл реактива Сомоджи, тщательно перемешивают и помещают на 15 минут в кипящую баню. 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 1%-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:

$X = (A - B) \cdot 30$, где

X - концентрация глюкозы, мг%;

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

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

8.8. Ошибка метода.

Ошибка метода составляет $\pm 5\%$

8.9. Количество определений в день составляет 50 проб

8.10. Физиологические пределы (см.7,10)

8.11. Источники литературы

8.11.1. Лабораторные исследования в ветеринарии. М., 1971.428-430.

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

9.1. Принцип метода

Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиокарбазида 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 стойкий.

9.2.3. 0,25%-ный раствор тиокарбазида (или 0,32%-ный раствор тиокарбазида солянокислого). Реактив устойчив 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 водой 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 1 мл концентрированной серной кислоты.

9.2.6. Цветной реактив. К 30 мл. раствора хлорного железа добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиокарбазида. 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 105С до постоянного веса и растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой.

9.2.10. Алюминиевая фольга.

9.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

9.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч – 10 г.

9.3.2. Железо хлорное (железо трехлористое), б-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 чда – 0,4 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 хивические.

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 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, обернутой алюминиевой фольгой, выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. (точно) и затем охлаждают в течение 2-3 мин под струей водопроводной воды.

9.6.5. Измерение проводят на фотоэлектроколориметре при зелёном светофильтре (№6) в кювете 1 см против контроля не позднее, чем через 15 мин. после охлаждения.

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

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

9.6.8. Расчета результатов

Но полученным величинам оптической плотности опытной пробы (А) и стандарта (В) рассчитывают концентрацию мочевины в пробе по формуле: Мочевина, мг%

$$= A/B * 25$$

9.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет

±4%

9.9. Количество определений в день

В течение рабочего дня один исследователь проводит 60 анализов.

9.10. Физиологические пределы. Смотри пункт 6.9.

9.11. Источники литературы

Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований, М., 1973, 66-69.

10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩИХ ЛИПИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО БАУМАН

10.1. 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.

10.2. Реактивы

10.2.1. Насыщенный раствор Судана черного (0,3 г Судана чёрного в 100 мл этилового спирта).

10.2.2. Абсолютный этиловый спирт.

10.2.3. Уксусная кислота ледяная (хч).

10.2.4. Смесь абсолютного этилового спирта и ледяной уксусной кислоты 4:1.

10.2.5. Стандартней раствор: 0,2 г холестерина или 0,2 г трибутирина или триолеина в 100 мл абсолютного спирта.

10.2.6. Бумага хроматографическая "медленная".

10.3. Количество необходимых реактивов на 100 алалазод

10.3.1. Судан черный - 0,1 г.

10.3.2. Абсолютный этиловый спирт - 250 мл.

10.3.3. Уксусная кислота ледяная - 300 мл.

10.3.4. Холестерин кристаллический - 0,5 Г.

10.4. Специальное оборудование и аппаратура

10.4.1. ФЭК-56, ФЭК-И и др.

10.4.2. Рамка для натягивания бумажных полосок.

10.4.3. Пробирки центрифужные.

10.4.4. Пипетки градуированные на 0,1 и 1,0 мл.

10.5. Материал для исследования

Материалом служит негемолизированная сыворотка крови.

10.6. Ход определения

10.6.1. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки, 0,1 мл раствора Судана черного, осторожно перемешивают и дают стоять 30 мин.

10.6.2. Центрифугируют 20 минут при 2000-3000 об/мин.

10.6.3. Окрашенную сыворотку вливают 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.

10.6.6. 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 1 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 стандартны растворов холестерина (трибутирана, триолеина) разной концентрации.

10.3. Ошибка метода

Спайка метода составляет $\pm 5\%$.

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 2.

10.11. Источники литературы

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

11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА ПО ИЛЬКУ

11.1. Принцип метода Холестерин в присутствии уксусного ангидрида и смеси

уксусной и серной кислот дает изумрудное зеленое окрашивание, интенсивность которого прямопропорционально концентрации.

11.2. Реактивы

11.2.1. Смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и серной кислоты 1:5:1. Бесцветная или слегка желтоватая. Хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

11.2.2. Стандартный раствор холестерина. Берут 100 мг холестерина, растворяют в 2 мл хлороформа в мерной колбе на 100 мл и доливают до метки абсолютный спирт. Раствор хранят в холодильнике, в посуде из темного стекла с притертой пробкой.

11.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

11.3.1. Уксусная кислота, хч - 50 мл.

11.3.2. Уксусный ангидрид, чда - 250 мл.

11.3.3. Серная кислота, хч - 50 мл.

11.4. Специальное оборудование и аппаратура

11.4.1. Холодильник бытовой.

11.4.2. Фотоэлектроколориметр.

11.4.3. Термостат.

11.4.4. Колба мерная на 100 мл.

11.4.5. Пипетки на 0,2 мл и 5 мл.

11.4.6. Штатив для пробирок на 40 гнезд.

11.5. Материал для исследования

Материалом служит негемолизированная сыворотка крови. 11.6. Ход определения

11.6.1. К 3 мл смеси уксусного ангидрида, уксусной и серной кислот 5:1:1 прибавляют 0,15 мл негемолизированной сыворотки.

11.6.2. Пробирку энергично встряхивают 10-12 раз.

11.6.3. Ставят в термостат на 20 мин. при температуре 37°C.

11.6.4. Фотометрируют против смеси, при красном светофильтре, в (630-630 нм) кювете с толщиной слоя 0,5 см.

11.7. Расчеты результатов

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

11.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет 5%.

11.9. Время необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь проводит 100 анализов.

11.10. Физиологические пределы

Содержание общего холестерина в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2. Понижение или повышение уровня холестерина в сыворотке крови бывает при заболеваниях печени.

11.11. Источники литературы

11.11.1. 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 кетонные тела распадаются до ацетона. Последний соединяется с йодом, образуя комплексное соединение. При помощи гипосульфата свободный йод оттягивая и по разности между контролем и опытом определяют связанный йод.

12.2. Реактивы

12.2.1. Биохроматная смесь - 5 г двуххромовокислого калия тщательно смешивают с 50 мл концентрированной серной кислоты и 250 мл дистиллированной воды.

12.2.2. 20%-ный раствор серной кислоты.

12.2.3. 10%-ный раствор едкого натра.

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

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

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

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

12.2.7. 0,3 н. раствора едкого натра.

12.2.8. 5%-ный раствор сернокислого цинка.

12.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

12.3.1. Калий двуххромовокислый, чда - 60 г.

12.3.2. Серная кислота концентрированная, чда - 600 мл.

12.3.3. Натр едкий, хч - 5 г.

12.3.4. Раствор йода 1 н. - 100 мл.

12.3.5. Раствор гипосульфита 1 н. - 100 мл.

12.3.6. Крахмал растворимой, ч - 1 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. Стаканчика химические на 75 и 100 ьл.

12.5.1. Материал для исследования

Материалом служить сезонное безбелковое фильтрат крови. 12.6. Ход определения

12.6.1. Готовят безбелковый фильтрат крови по методу Сомоджи. К 5 мл гепаринизированной крови добавляют 25 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3 н. раствора едкого натра и 10 мл 5%-ного раствора сернокислого цинка. Перемешивают стеклянной палочкой и через 30 мин. центрифугирует 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 жадность.

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 смазывают наибольшим 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.

12.7. Расчеты результатов

Содержание общего количества кетоновых тел проводят по формуле:

$X \text{ мг}\% = (A - B) * 0,25 * 100$, где X - количество кетоновых тел, мг%;

A - количество мл 0,01 н. раствора гипосульфита, пошедшее на связывание свободного йода в контрольной пробе;

B - количество мл 0,01 н. раствора гипосульфита, затраченное на связывание свободного йода в опытной пробе;

1 мл 0,01 н. раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона;

100 - коэффициент перевода в мг%.

12.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$

12.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь проводят 18 анализов при наличии 8 перегонных аппаратов.

12.10. Физиологические пределы

12.10.1. Повышение кетоновых тел в крови (кетонемия) выше бг% является одним из основных признаков предклинической формой 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.

12.10.2. Кетонемия может быть и при нарушениях рубцового пищеварения вследствие дефицита в кормах макроэлементов, гиподинамия, а также при гиперфункции щитовидной железы, вследствие усиленного распада жиров, белков и углеводов.

12.10.3. При клинической форме кетоза содержание кетоновых тел в крови значительно возрастает и увеличивается выделение их с мочой и молоком (выше 10 мг%), что улавливается качественной пробой Достаде.

12.11. Источники литературы

Лабораторные исследования в ветеринарии. Изд-во "Колос", М., 1071. 430-432.

13. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КАЛЬЦИЯ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КОМПЛЕКСОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ ПО УИЛКЕНСОНУ

13.1. Принцип метода Мурексид при pH 10-13 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. 13.2. Реактивы

13.2.1. 0,005 н. раствор динатриевой соли ЭДТА (трилон Б). 0,932 г вещества растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят до метки, добавляют несколько капель хлороформа или толуола. 1 мл такого раствора ЭДТА, эквивалентен 0,1 мг кальция.

13.2.2. 1,8 н. раствор едкого натра. 7,2 г вещества растворяет в дистиллированной воде, после охлаждения объем доводят до 100 мл.

13.2.3. Водный раствор индикатора мурекоида (пурпурат аммония) содержащий в 1 мл 1 мг вещества. Готовят в день проведения анализов. Хранят в холодильнике не более 3 суток.

13.4.4. Стандартный раствор углекислого кальция. 2,435 г предварительно высушенного до постоянного веса при температуре 105-110°C углекислого кальция, помещают в колбочку на 150-200 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 1 л и после охлаждения доводят дистиллированной водой до метки. 1 мл содержит 1 мг кальция.

13.2.5. Установление титра ЭДТА. 1 мл 0,005 н. раствора ЭДТА эквивалентен 0,1 мг кальция, содержащемуся в 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция. Берут 0,1 мл стандартного раствора кальция, добавляют 0,1 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н. раствора едкого натра, 2 капли раствора индикатора мурейсада и титруют до перехода розовой окраска в фиолетовую (окраска контроля). Проводят не менее 6 параллельных определений и вычисляют среднюю величину раствора ЭДТА. Титр ЭДТА равен единице, деланной на количество мл 0,005 н. раствора ЭДТА, пошедшее на титрование 0,1 мл стандартного раствора углекислого кальция.

13.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

13.3.1. Этилендиаминтетрауксусная кислота динатриевая соль (трилон Б, хелатон), чда - 0,1 г. 13.3.2. Натр едкий, хч – 3,2 г.

13.3.3. Мурексид, чда - 0,1 г.

13.3.4. Кальций углекислый, безводный, хч - 0,25 г.

13.4. Специальное оборудование и аппаратура.

13.4.1. Стаканчики химические.

13.4.2. Пипетка на 0,1, 1,0 и 2,0 мл.

13.4.3. Колбы мерные на 100, 200, а 1000 мл.

13.4.4. Колбы конические из термостойкого стекла на 150-200 мл.

13.4.5. Электроплитка.

13.4.6. Микробюретки на 2,0 и 1,0 мл.

13.5. Материал для исследования

Материалом служит сыворотка крови.

13.6. Ход определения

13.6.1. В контрольный стаканчик вносят 3,4 мл бидистиллированной воды, 0,4 мл 1,8 н. раствора едкого натра и 2 капли индикатора. Раствор окрашивается в фиолетовый цвет.

13.6.2. В опытный стаканчик вносят 9 мл воды, 0,4 мл 1,6 н. раствора едкого натра, 0,4 мл сыворотки, 2 капли индикатора. Появляется светло-розовая окраска.

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

13.6.4. Индикатор вносит в опытные образцы и стандарт непосредственно перед титрованием. Через 5-6 определений ставят новый контроль.

13.7. Расчеты результатов

Расчет проводится по формуле:

$$Ca, \text{ мг}\% = P \cdot T \cdot 0,1 \text{ мг} \cdot 100 \text{ мл} / 0,4 \text{ мл} \text{ или } Ca, \text{ мг}\% = P \cdot T \cdot 25$$

P – количество мл раствора ЭДТА, пошедшего на титрование пробы; T – титр раствора

ЭДТА;

25 – постоянный коэффициент.

13.8. Ошибка метода

Ошибка метода при соблюдении описанных условий и соответствующих навыков составляет $\pm 5\%$

13.0. Время необходимое для проведения исследований

В течение дня один исследователь производят 100

анализов. 13.10. Физиологические пределы

13.10.1. Содержание общего кальция в сыворотке крови здоровых животных представлено в таблице 2.

13.10.2. 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.

13.10.3. Снижение содержания кальция в крови (гипокальциемия) наблюдают при длительном дефиците его в рационе ила при плохом усвоении при недостатке витамина Д, протеина, углеводов и избытке фосфора и цинка. Гипокальциемия бывает при тяжелых формах остеодистрофия, пастбищной тетании, родильном парезе.

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

13.10.5. Определение кальция в сыворотке крови или плазме (показатели одинаковы) необходимо также для характеристика кальций-фосфорного соотношения.

13.11. Источники литературы

13.11.1. Луцкий Д. л. К методике комплексометрического определения кальция в сыворотке крови. Ветеринария, 1968, 3, 108.

14. ПРИНЦИП НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ С ВАНАДОМ-МОЛИБДАНЫМ РЕАКТИВОМ

14.1. Принцип метода

Фосфор в безбелковом фильтрате крови с ванадат – молибдатным реактивом образует лимонно-жёлтое окрашивание, интенсивность которого пропорциональна его количеству в пробе.

14.2. Реактивы

14.2.1. 20%-ный раствор трихлоруксусная кислота (ТХУ). Берут 20 г ТХУ и растворяют в 60 мл дистиллированной воды.

14.2.2. Концентрированная серная кислота, хч.

14.2.3. Раствор молибдата аммония. 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°C. После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают, переносят в мерную колбу и доливают дистиллированной водой до 1 л. Хранится долго.

14.2.4. 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, а доливают дистиллированной водой до 1 л. Реактив стоек.

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

14.2.6. Стандартный раствор фосфора. 4,394 г однозамещенного фосфата калия, высушенного до постоянного веса в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, растворяют, в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. Из него готовят рабочий раствор путем разбавления в 60 раз (1 мл до 50) , который содержит 0,02 мг фосфора в 1 мл.

14.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

14.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч - 75 г.

14.2.2. Серная кислота концентрированная, хч - 10 мл.

14.3.3. Аммоний молибденовокислый, чда, хч - 1 г.

14.3.4. Аммоний ванадиевокислый, чда - 0,3 г.

14.3.5. Калий фосфорнокислый однозамещенный, чда, хч - 4,5

г.

14.4. Специальное оборудование и аппаратура

14.4.1. Фотоэлектроколориметр

14.4.2. Колбы конические термостойкие на 1000 мл.

14.4.3. Колбы мерные на 50, 100, 500 и 1000 мл.

14.4.4. Электроплитка.

14.4.5. Пипетки градуированные.

14.4.6. Центрифуга.

14.4.7. Штативы для пробирок

14.5. 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.

14.6. Ход определения

14.6.1. К 0,5 мл безбелкового фильтрата крови приливают 1,5 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор (14.2.5) перемешивают и дают стоять 2 часа.

14.6.2. Центрифугируют при 1500-2000об/мин в течение 5-10 минут для осветления смеси.

14.6.3. Фотометрируют при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной, 1 см против контроля (2 мл дистиллированной воды и 2 мл реактива на фосфор).

14.6.4. Для построения калибровочной кривой берут 0,5; 1,0; 1,5 мл рабочего стандартного раствора (14.2.6.), добавляют по 0,25 мл 20% ТХУ, 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.

14.7. Расчеты результатов

Расчет проводят по формула:

$$P \text{ мг\%} = C \cdot 4 \cdot 100, \text{ где}$$

C - количество мг фосфора по калибровочному графику,

4 – разведение пробы крови;

100 - пересчет на 100 мл.

14.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $4 \pm 1\%$.

14.9. Время необходимое для проведения исследований.

В течение дня один исследователь производит 60 анализов.

14.10. Физиологические пределы

14.10.1. Содержание неорганического фосфора в безбелковом фильтрате цельной крови, плазмы или сыворотки одинаково, если последние отдалены от форменных элементов сразу после взятия пробы крови и фильтрат получен одновременно. Физиологические пределы представлены в таблица 2.

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

14.10.3. Повышение уровня фосфора в крови (гиперфосфатемии) бывает при гипофункции паращитовидных желез, высококонцентратном типе кормления, острой форме остеодистрофии, повышенном поступлений в организм витамина Д.

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

14.11. Источники литературы

14.11.1. Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л.А. Ветеринария, 7, 1972.

14.11.1. Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л.А. Ветеринария, 14, 11, 38-42.

15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО МАГНИЯ В БЕЗБЕЛКОВОМ ФИЛЬТРАТЕ КРОВИ С ТИТАНОВЫМ ЖЁЛТЫМ

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

15.2. Реактивы

15.2.1. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г ТХУ и растворяют в 60 мл дистиллированной воды.

15.2.2. 0,01%-ный раствор поливинилового спирта. Растворяют 100 мг в 1 л бидистиллированной воды при подогревании. Реактив стоек.

15.2.3. 0,01%-ный раствор титанового желтого. Реактив готовится в день анализа на бидистиллированной воде.

15.2.4. 2 н.раствор едкого натра. Растворяют 80 г вещества в 1 л бидистиллированной воды.

15.2.5. Стандартный раствор магния. 0,168 г прокаленной окиси магния растворяют сначала в 2,5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят бидистиллированной водой, 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 на обходимых растворов на 100 анализов,

15.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч - 25 г.

15.3.2. Поливиниловый спирт, ч - 0,010 г.

10.3.3. 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 аппаратуру

15.4.1. Фотоэлектродколориметр.

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.

15.6. 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 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, далее по п.15.6.1.

15.7. Расчеты, результатов

15.7.1. По результатам измерений стандартных растворов магния вычерчивают калибровочную кривую.

15.7.2. Берут 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0 мл рабочего стандартного раствора магния, анализируют, как и образцы крови. Общий объем до 20 мл доводят бидистиллированной водой.

15.7.3. Расчет производят по формуле:

$$\text{Mg, мг\%} = X \cdot 2 \cdot 100 / \Pi, \text{ где}$$

x - количество магния в мг по калибровочной кривой;
Π - количество мл безбелкового фильтрата крова, взятого на анализ; 2 - степень разведения крови;

100 - пересчет на 100 мл крова.

15.7.4. При Π = 0,5 мл формула представляют следующее:

$$\text{Mg, мг\%} = x \cdot 400.$$

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

15.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $3 \pm 1\%$.

15.9. Время необходимое для проведения исследований

В течение рабочего дня один исследователь производит 50 анализов.

15.10. Физиологические пределы

15.10.1. Содержание неорганического магния в крови здоровых животных представлено в таблице 2.

15.10.2. Снижение содержания неорганического магния в крови (гипомагниемия) наблюдается при дефиците магния в организме, пастбищной тетании.

15.10.3. Повышение уровня неорганического магния в крови (гипермагниемия) бывает редко, например, при отравлениях солями магния.

15.11. Источники литературы

Петрухин И.В. Труды Смоленской НИВС, 1960, вып. 1., 188-199.

16. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛИЯ И НАТРИЯ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПЛАМЕННОЙ ФОТОМЕТРИИ

16.1. Принцип метода

16.1.1. 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.

16.1.2. 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.

16.2. Реактивы:

16.2.1. Стандартный раствор натрия основной. Берут 2,5418 г хлористого натрия, высушенного до постоянного веса при температуре 105°C, и растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг натрия.

16.2.2. Рабочие стандартные растворы натрия, содержащие 15,20 и 25 мг натрия в 1 литре. Для этого будут соответственно 1,5; 2,0 и 2,5 мл основного стандартного раствора и доводят дистиллированной водой в мерных колбах на 100 мл до метки.

16.2.3. Стандартный раствор калия основной. Берут 1,9069 г хлористого калия, высушенного до постоянного веса при температуре 105 °С, и растворяют в 1 л дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия.

16.2.4. Рабочие стандартные растворы калия, содержащие 5; 7,5; 1,0 и 1,5 мг калия в 1 литре. Для этого берут в мерные колбы на 100 мл соответственно 0,5; 0,75; 1,0 и 1,5 мл основного стандартного раствора калия, добавляют в каждую колбу по 15 мл основного стандартного раствора натрия (п.16.2.1.) и доливают дистиллированной воды до метки.

16.3. Количество необходимых реактивов на 100.аналдзод

16.3.1. Натрий хлористый, хч - 2,6 г.

16.3.2. Калий хлористый, хч - 2,0 г.

16.4. Специальное оборудование и аппаратура

- 16.4.1. Пламенный фотометр.
- 16.4.2. Сушильный шкаф.
- 16.4.3. Колбы мерные.
- 16.4.4. Пипетки, градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.
- 16.4.5. Бюретка измерительная на 60 мл.
- 16.4.6. Пробирки химические.
- 16.4.7. Флаконы пенцилиногзые.
- 16.5. Материал для исследования

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

16.6. Ход определения

16.6.1. Для определения калия берут 0,5 мл плазмы и вносят в пенициллиновый флакончик, добавляют из бюретки 9,5 мл дистиллированной воды, закрывают резиновой пробкой, а путем перевертывания тщательно перемешивают. Разведение соответствует 1:20.

16.6.2. Для определения натрия плазму крови разводят 1:150, для чего берут 1 мл разведенной 1:20 плазмы (п.16.6.1), вносят в другой флакончик и приливают 6,5 мл дистиллированной воды.

16.6.3. Подготовка прибора к работе описана в инструкции, прилагаемой к прибору.

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

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

16.6.6. Капилляр промывает дистиллированной водой и в пламя горелки добавляют исследуемые пробы также не менее 2-х раз. Показателя прибора заносят в журнал исследований.

16.6.7. Через каждые 6-6 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.

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

16.6.9. В конце исследования капилляр распылителя промывается дистиллированной водой, отключается газ, а затем

воздух, выключается прибор из электросети, закрываются диафрагма и фотоэлемент и снимаются светофильтры.

16.7. Расчеты результатов

Содержание калия, а натрия в плазме крови рассчитывают по калибровочный кривым, построенным на основании измерений рабочих стандартных растворов с учетом степени разведения для калия 1:20, для натрия - 1:150.

16.8. Ошибка метода

Ошибка метода при соблюдении режима работы прибора и показаний стандартных растворов составляет $\leq 2\%$.

16.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение дня один исследователь производит 150

анализов. 16.10. Физиологические пределы

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

16.10.2. Снижение натрия в плазме крови (гионатриемия) отмечают при длительной солевом голодании, что может привести к нарушениям обмена веществ типа ацидоза, кетоза, остеодистрофии.

16.10.3. Повышении натрия в плазме крови (гипернатриемия) устанавливают при поедании большого количества свежей молодой травы в первые недели после выгона на пастбище, при пастбищной тетании.

16.10.4 Большое поступление калия с кормом может выводить натрий из организма.

16.11 Источники литературы

16.11.1 Брикер В.Н. Лабораторное дело, 1961, 7,3.

16.11.2. Вержиковская В.Г., Попов В.В. Лабораторное дело, 1963, 6, 21-24.

16.11.3. Инструкция к пламенному фотометру.

17. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФОТАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ГИДРОЛИЗУ БЕТТА-ГЛИЦЕРОФОСФАТА.

17.1. Принцип метода

Под действием фермента сыворотки крови β -глицерофосфат натрия подвергается гидролизу с освобождением неорганического

фосфора. Активность фермента определяют по количеству освободившегося неорганического фосфора.

17.2. Реактивы

17.2.1. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Берут 20 г вещества и растворяют в 80 мл дистиллированной воды.

17.2.2. Серная кислота концентрированная, уд. веса 1,84.

17.2.3. Бета-глицерофосфатный субстрат. 2,5 г бета-глицерофосфата натрия в 2,12 г., 5,5 -диэтилбарбитуровой кислоты натриевой соли (мединала) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе на 500 мл до метки. рН $9,0 \pm 0,1$. Хранят в холодильнике под слоем толуола в течение 7 дней.

17.2.4. Раствор молибдата аммония. 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50°C . После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают и переносят в мерную колбу на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки.

17.2.5. Раствор ванадата аммония, 2,5 г растворяют в 500 мл кипяченой воды. Кипячение продолжает до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 1 л и доливают дистиллированной водой до метки.

17.2.6. Реактив на фосфор. Готовят путем смешивания растворов молибдата и ванадата аммония в равных объемах. Реактив пригоден в течение 1-2-х месяцев.

17.2.7. Стандартный раствор фосфора основной. 0,439 г однозамещенного фосфата калия, высушенного над концентрированной серной кислотой, растворяют в 100 мл дистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг фосфора. Из него готовят рабочий стандартный раствор. Ведет 5 мл основного раствора, и доводят дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл до мотка.

17.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

17.3.1. Трихлоруксусная кислота, ч - 50 г.

17.3.2. Серная кислота, хч, уд. вес 1,84 - 15 мл.

17.3.3. Бета-глицерофосфат натрия, ч - 1,25 г. (динатрий 2-глицерофосфат)

17.3.4. 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевая соль (мединал), ч - 1,10 г.

17.3.5. Аммоний молибденовокислый, чда - 15 г.

17.3.6. Аммоний ванадмевокислый, чда – 0,4 г.

17.3.7. Калий фосфорнокислый однозамещённый, хч – 0,5 г.

17.4. Специальное оборудование и аппаратура

17.4.1. Фотоэлектроколориметр.

17.4.2. Термостат.

17.4.3. Холодильник.

17.4.4. Центрифуга.

17.4.5. Пробирки центрифужные.

17.4.6. Колбы мерные на 100 и 500 мл.

17.4.7. Эксикатор.

17.4.8. Электроплитка.

17.4.9. Стеклянные палочки.

17.5. Материал для исследования

Материалом для исследования служит сыворотка крови.

17.6. Ход определения

17.6.1. В центрифужные пробирки наливают по 2,5 мл бета-глицерофосфатного субстрата и ставят в термостат при температуре 37°C на 15 мин. На каждую пробу берут по 2 пробирки (№1 и №2) и на серию исследований по 2 пробирки на контроль (№3 и №4) и по 2 пробирка на стандарт (№5 и №6).

17.6.2. Через 15 минут в пробирку №1 добавляют 0,5мл сыворотки и продолжает нагревать все пробирки в термостате при 37°C в течение 60 мин. (точно!).

17.6.3. Пробы охлаждают, а затем вносят: в пробирку №2 0,5 мл сыворотка, №3 и №4 по 0,5 мл дистиллированной воды, №5 и №6 – по 0,5 мл рабочего стандартного раствора фосфора.

17.6.4. Во все пробирка приливают по 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 20 мин, при 1500 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 ара длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете толщиной слоя 1 см против контроля.

17.7. Расчеты результатов

Расчеты проводят по формулам:

$$X_1 = A_1 / V$$

$$X_2 = A_2 / V * 5$$

$X_1 - X_2 = \text{АЩФ}$, где

X_1 – оптическая плотность исследуемой пробы после инкубации;

X_2 – оптическая плотность исследуемой пробы до инкубации;

V – 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 глицериновым субстратом;

X_2 – количество мг неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки до инкубации ее с глицериновым субстратом;

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

17.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

17.9. Время, необходимое для проведения исследований

В течение дня один лаборант проводят анализ в 30 образцах сыворотки крови.

17.10. Физиологические пределы

17.10.1. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови здоровых животных представлена в таблице 2.

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

17.11. Источники литературы

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

17.11.4, Коромыслов В.Ф., Кудрявцева Л, А. Ветеринарии, 1972, 10, 119.

18. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО РЕЗЕРВА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ДИФФУЗНЫМ 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 вошедшего, а реакцию с углекислым газом, и половину натрия углекислого (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2 , оттитровывается раствором едкого натра определяют количество выделенного из плазмы углекислого газа, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов (NaHCO_3)

18.2. Реактивы

16.2.1.0,1 н.раствор серной кислоты (из фиксаля).

18.2.2. 0,02 и 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 бутылки, 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 спиртовой раствор фенолфталеина.

18.2.7. Вазелиновое масло.

18.2.8. 1%-ный раствор гепарина.

18.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

18.3.1. Серная кислота, фиксаля - 1 шт.

18.3.2. Натр едкий, хч - 4 г.

18.3.3. Серная кислота концентрированная, хч - 3 мл.

18.3.4. Фенолфталеин - 0,3 г.

18.3.5. Вазелиновое масло - 100 ил.

18.3.6. Гепарин - 0,3 г.

18.4. Специальное оборудование и аппаратура

13.4.1. Сдвоенные колбы с резиновыми пробками

16.4.2. Микробюретки на 2 и 5 мл.

18.4.3. Штативы универсальные.

18.4.4. Пипетки на 1, 2, 5 мл.

18.4.5. Бутыль с тубусом.

18.4.6. Центрифужные пробирки из толстого стекла.

10.4.7. Центрифуга.

18.4.8. Колбы мерные на 100 и 1000 мл.

18.5. Материал для исследования

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

18.6. Ход определения

18.6.1. В чистые, сухие центрифужные пробирки вносят 0,5-1,0 мл вазелинового масла, 2-3 капли 1%-ного раствора гепарина, а закрывают пробками, нумеруют.

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

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

16.6.4. 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 1 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.

18.8.8. 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), и контроле (не менее 4-х колб) вместо плазмы вносят дистиллированную воду. Перемешивание плазмы с кислотой проводят не менее 3-х раз.

16.6.6. 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 а 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:

$$X \text{ об. \%CO}_2 = (V_K - V_{II}) * 0,448 / V_{II} = 100, \text{ где}$$

V_K - количество 0,02 н. раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование контрольного образца;

V_{II} - количество 0,02 н. раствора серной кислоты в мл, пошедшего на титрование исследуемого образца;

$V_K - V_{II}$ - 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 $3 \pm 1\%$

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 И.Е. Ветеринария, 1974, 1, 89-92.

18.11.3. Кондрахин И. П., Петров Ц.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 (СЫВОРОТКЕ) 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.

19.2.4. Ксилоло-октановая смесь (1:1). Готовят в день проведения анализов.

13.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

19.3.1. Ксилол, ч. - 150 мл,

19.3.2. Октан, х.ч. - 150 мл.

19.3.3. Спирт этиловый 96%-ный - 100 мл.

19.3.4. Калий едкий - 76 г.

19.4. Специальное оборудование и.аппаратура

19.4.1. Спектрофотометр типа ОФ-16, ОФ-4 и др.

19.4.2. Пробирки из стекла пирекс с пришлифованными пробками.

14.4.3. Центрифужные пробирки.

19.4.4. Пипетки, градуированные на 1, 5, 10 мл.

19.4.5. Водяная баня.

19.4.6. Ультрафиолетовая лампа 11РК-4.

19.4.7. Вентилятор настольный.

19.4.8. Центрифуга.

19.4.9. Мерные цилиндры на 250 мл.

19.4.10. Стеклянные палочки.

19.5. Материал для исследования Материалом для исследования служит плазма крови;

19.6. Ход определения

19.6.1. В центрифужную пробирку набирают 1 мл плазмы крови и добавляют такое же количество 1 н. спиртового раствора едкого калия.

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

19.6.3. Пробу охлаждают в воде со льдом в течение 5-10 минут и добавляют 3 мл ксилоло-октановой смеси.

19.6.4. Пробирку со смесью сильно встряхивают и дают постоять, после чего центрифугируют 5 минут при 1500 об/мин.

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

19.6.6. Для определения витамина А пробы фотометрируют при длине волны 328 нм до и после облучения их ультрафиолетовыми лучами с использованием дейтериевой лампы и светофильтра 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 о помощью настольного вентилятора.

19.7. Расчеты результатов

Витамин А, мкг% = $637 \cdot E_1 \cdot 3$

Каротин, мкг% = $480 \cdot E_2 \cdot 3$; где

480 и 637 - постоянные коэффициенты;

E_1 - 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 $5 \pm 1\%$.

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-стойловый 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, 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. Реактива

20.2.1. Хлороформ очищенный, обезвоженный. Химически чистый хлороформ промывают 2-3 раза дистиллированной водой, обезвоживают серноокислым 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 (21-23%-ный) при температуре 20°C 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) растворяют в 400 мл дистиллированной воды.

20.2.6. Уксусный ангидрид, ч.

20.2.7. 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

20.2.8. Серная кислота концентрированная (уд. вес 1,64), хч.

20.2.9. Баллон с углекислотой.

20.2.10. Натрий серноокислый безводный.

20.2.11. Медь серноокислая, хч, чда.

20.2.12. Кобальт азотноокислый, чда.

20.2.13. Стандартный раствор основной. Берут 7,5 г серноокислой меди, высушенной в сушильном шкафу при температуре 105°C до постоянного веса и 0,35 г азотноокислого кобальта, высушенного в течение 48 ч. в эксикаторе над серной кислотой и растворяют в 50 мл дистиллированной воды.

20.2.14. Рабочие стандартные растворы для пробирок-эталонов.

Кол-во основного раствора, мл	Кол-во дистил. воды, мл	Общий объем, мл	Число синих единиц
---	10,0	10	0
0,73	9,27	10	0,75
0,97	9,03	10	1,00
1,24	8,79	10	1,25
1,46	8,54	10	1,60
1,70	8,30	10	1,75
1,94	6,06	10	2,00
2,42	7,58	10	2,50
2,91	7,09	10	3,00
3,40	6,60	10	3,50
3,88	6,12	10	4,00
4,37	5,63	10	4,50
4,85	5,15	10	5,00

Рабочие стандартные растворы хранят в пробирках, закрытия 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%-кий - 1,75 л.

20.3.7. Натрий серноокислый, безводный, хч, яда - 2 кг.

20.3.8. Фенолфталеин - 1 г.

20.3.3. Эфир серный для наркоза - 15 л.

20.4. Специальное оборудование и аппаратура та

20.4.1. Бюретка с притертым краном на 10-15 мл для треххлористой сурьмы.

20.4.2. Водная баня.

20.4.5. Пробирки центрифужные.

20.4.4. Пробирки химические.

- 20.4.5. Воздушные холодильники - стеклянные трубки.
- 60.4.6. Пипетки измерительные на 1, 2, 5, 10 мл.
- 20.4.7. Сушильный шкаф.
- 20.4.8. Перегонный аппарат стеклянный на тяжбах.
- 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 маркие.
- 26.4.14. Холодильник бытовой.
- 20.4.15. Делительные воронки.
- 20.4.16. Колбы Бюрца.
- 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), а ставят для гидролиза в воздушную баню при температуре 60°C на 2-2,5°C. 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, временами от времени приоткрывая кран.

20.6.7. После четкого расслоения нижнюю (темную) жидкость вливают в другую делительную воронку, добавляют 30-40 мл серного эфира, а 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, 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 частую 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 температура 60°C 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, обёрнутой алюминиевой фольгой.

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

20.7. Расчеты результатов

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

Вит. А, мкг% = $p \cdot V \cdot 1000 / v \cdot 4$, где

p - число синих единиц, установленных по шкале стандартов;

V - объем хлороформа, взятого для растворения сухого остатка, мл;

v - количество плазмы крови, взятого для анализа, мл;

4 - постоянный коэффициент;

1000 -коэффициент пересчета а мкг%.

20.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $\pm 5\%$.

20.9. Время, необходимое для проведения исследования

В течение дня один исследователь производит 30 анализов. 20.10. Физиологический пределы

Содержание витамина А в сыворотке крови представлено в таблице 2.

20.11. Источники литературы

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

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

21. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В ПЛАЗМЕ (СЫВОРОТКЕ) КРОВИ ФОТОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

21.1. Принцип метода

Каротин извлекается из безбелкового фильтрата плазмы крови патролейным эфиром или авиационным бензином и определяется коллориметрически.

21.2. Реактивы

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

21.2.2. 96 %-ный этиловый спирт.

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

21.2.4. Рабочий стандартный раствор готовят в день анализа путем разводят до основного стандартного раствора 1:1.

21.3. Количество необходима; 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 двуххромовокислый, х. ч. - 360 мг.

21.4. Специальное оборудование и аппаратура.

21.4.1. Фотоэлектроколориметр.

21.4.2. Химические пробирки.

21.4.3. Пипетки на 1, 5, 10 мл.

21.4.41. Мерные колбы на 250 и 500 мл.

21.4.5. Стеклянные палочки.

21.5. Материал исследования

Материалом для исследования служит плазма крови.

21.6. Ход определения

21.6.1. В пробирку вносят 1 мл плазмы крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин.

21.6.2. К осадку добавляют 5 мл петролейного эфира или авиационного бензина, встряхивают в течение 2 мин, центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин.

21.6.3. Верхний слой осторожно вливают в пробирку и колориметрируют на ФЭКе при синем светофильтре с толщиной слоя 1 см против контроля (дистиллированная вода, спирт, эфир или бензин).

21.6.4. Параллельно колориметрируют рабочий стандартный раствор, обработанный так же, как и основные пробы.

21.7. Расчеты результатов

Расчет проводят по формуле:

$$X = E_{\text{пр}}/E_{\text{ст}} * 1,248, \text{ где}$$

X - количество каротина в мг%; $E_{\text{пр}}$ - оптическая плотность исследуемого образца; $E_{\text{ст}}$ - оптическая плотность стандартного раствора; 1,248 - коэффициент пересчета в мг%.

1.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

21.9. Время, необходимое для проведения исследования

Время на одно исследование 3-5 минут. В течение рабочего дня в среднем 60 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 2.

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 трёхвалентное

железо в двухвалентное. Последнее образует с $\alpha\alpha'$ -дипиридиллом комплексное соединение розового цвета.

22.2. Реактивы

22.2.1. %%-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 омочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г $\alpha\alpha'$ -дипиридила прилить 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 56 мл долить бидистиллированной воды до метки.

22.2.5. 85%-ная фосфорная кислота, орто.

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 треххлорное), 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 пробирка,

22.4.4. Колбы мерные на 50 и 100 мл.

22.4.6. Пипетка 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 г/л 1%-ного раствора α' -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 мл против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытными пробами).

22.7. Расчета 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 г. л 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 и доводят до метки дистиллированной водой.

22.7.3. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют до 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α' -дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора хлорного железа перемешивают и оставляют на 20 мин. для проявления окраски.

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

22.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $3 \pm 1\%$

22.9. Время, необходимое на проведение исследований

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 плазма.

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

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

23.1. Принцип метода Йод в присутствии церий-арсенита образует окрашенное соединение, определяемое коллориметрически.

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 21,8 г углекислого натрия безводного и доводят в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой до 500 мл.

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 33 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 марковой колбе доводят бидистиллированной водой до 1 литра.

23.3. Количество необходимых реактивов на 100 анализов

23.3.1. Цинк серноокислый - 10 г.

23.3.г. 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.

23.3.0. 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°C.
- 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 перемешиваются 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 температур 400-450°C.
 - 23.6.7. Пробирки охлаждают, к золе добавляют 1 мл и 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 10 мин.
 - 23.6.9. В опытную пробирку вносят 3 мл центрифугата, 1 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты.
 - 23.6.10. К контрольную пробирку вносят 3,5 мл бидистиллированной воды 0,5 мл н. раствора соляной кислоты 0,5

мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. раствора серной кислоты (наливают осторожно, обмывая ею стенки пробирки).

23.6.11. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при температуре 37°C.

23.6.12. Вместе с образцами в термостат помещают пробирку с раствором сульфата церия.

23.6.13. Через 10 мин в каждую пробирку (не вынимая из термостата) с интервалом в 1 мин (по секундомеру) вносят 0,5 мл раствора сульфата церия и перемешивают.

23.6.14. Фотометрируют через 12 мин (точно!) на ФЭКе при синем светофильтре (434 нм на спектрофотометре) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля, поочередно вынимая пробирки из термостата с интервалом в 1 мин.

23.7. Расчеты результатов

23.7.1. Расчет результатов производят по калибровочному графику.

23.7.2. В 4 пробирки (№1, №2, №3, №4) вносят по 0,5 мл 2 н. раствора соляной кислоты. В пробирку №1 добавляют 3,5 мл бидистиллированной воды, №2 - 2,5 бидистиллированной воды и 1 мл стандартного раствора Д (0,02 мкг йода), №3 - 1,5 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 пробирка вносит по 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и по 1 мл 3,5 н. растворе серной кислоты и затем производят все операции, как и с образцами (п.23.6.9. - 23.6.13.).

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

23.8. Ошибка метода

Ошибка метода составляет $5 \pm 1\%$.

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

23.12.2. Методические рекомендации по химическим и биохимическим исследованиям в зоотехнии. Дубцовы, 1975, стр. 76-81.

Оглавление

1. Введение.....	3
2. Отбор и подготовка проб крови	3
3. Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом.....	5
4. Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом.....	5
5. Определение белковых фракций в сыворотке крови нефелометрическим методом.....	8
6. Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксимом.....	11
7. Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по цветной реакции с орто-толуидином	13
8. Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по методу Сомоджи.....	16
9. Определение мочевины в сыворотке крови с диацетилмонооксимом (вариант 2).....	19
10. Определение общих липидов в сыворотке крови по Бууман...21	
11. Определение общего холестерина по Ильку.....	23
12. Определение общего количества кетоновых тел в безбелковом фильтрате крови йодометрическим методом.....	24
13. Определение общего кальция в сыворотке крови комплексометрическим методом по Уилкенсону	27
14. Принцип неоргонического фосфора в безбелковом фильтрате крови с ванадом-молибдановым реактивом.....	30
15. Определение неорганического магния в безбелковом фильтрате крови с титановым жёлтым.....	32
16. Определение калия и натрия в плазме крови пламенной фотометрии.....	35
17. Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу бетта-глицерофосфата.....	37
18. Определение щелочного резерва в плазме крови диффузным методом.....	40
19. Определение витамина А и каротина в плазме (сыворотке) крови спектрофотометрическим методом.....	43
20. Определение витамина А в плазме крови колориметрическим методом.....	46
21. Определение каротина в плазме (сыворотке) крови фотометрическим методом.....	50

22. Определение витамина С в плазме крови.....52
23. Определение йода, связанного с белком, в сыворотке крови по акланту в модификации С.В. Силаевой.....54