СПРАВОЧНИК

МЕТОДЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ



«КолосС»

619:616
М 545

УДК 619:616—07 (03)
ББК 48(03)
М54

Авторы: *И. П. Кондрахин, А. В. Архипов, В. И. Левченко, Г. А. Таланов, Л. А. Фролова, В. Э. Новиков*

Редактор *В. Н. Сайтаниди*

М54 **Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики**: Справочник / Под ред. проф. И. П. Кондрахина. — М.: КолосС, 2004. — 520 с., [4] л. ил.: ил.

ISBN 5—9532—0165—6

Приведены современные унифицированные методы исследования крови, мочи, молока, рубцового содержимого и кормов, позволяющие оценить состояние обмена веществ, функции отдельных органов и систем организма и в комплексе с другими методами поставить диагноз. Даны способы оценки качества кормов и их стандарты. Изложены современные методы определения фосфорорганических соединений, синтетических перитроидов, родентицидов и других ядовитых веществ. Описаны лабораторные тесты диагностики болезней органов и систем.

Для специалистов ветеринарного, зоотехнического и биологического профиля.

SDVU Axborot-resurs markazi
inv № 372511

УДК 619:616—07(03)
ББК 48(03)

ISBN 5—9532—0165—6

©Издательство «КолосС», 2004

ВВЕДЕНИЕ

В медицине и ветеринарии широко используются многочисленные общие клинические, гематологические, биохимические, биофизические, химикотоксикологические и другие методы исследования крови, мочи, молока, содержимого рубца, желудка, кишечника, печени, почек и т. д. Без этих методов немыслимы оценка состояния обмена веществ, функций отдельных органов и систем, постановка диагноза, контроль за эффективностью лечения. Использование унифицированных методов также необходимо при выполнении научных исследований в области ветеринарии, зоотехнии, биологии.

Диспансеризация животных, позволяющая осуществлять контроль за состоянием обмена веществ и здоровья в целом по стаду, своевременно выявлять преобладающие и сопутствующие болезни, их причины, основана прежде всего на использовании клинических лабораторных методов исследования. Без лабораторных диагностических тестов невозможно представить сущность патологического процесса, ход течения болезни, ее исход, доказуемость терапии.

Поскольку причины многих неинфекционных болезней животных, которые составляют более 80—85 % в структуре общей заболеваемости, — недоброкачественные корма, в справочнике описаны методы оценки качества кормов и их стандарты. Учитывая широкое распространение отравлений животных, в справочнике приведены методы определения фосфорорганических соединений (ФОС), синтетических перитроидов, родентицидов, микотоксинов, алкалоидов, цианогенов и других ядовитых веществ.

Особое место в справочнике отведено методам исследования содержимого рубца, так как без оценки состояния рубцового пищеварения невозможно понять исходные механизмы многих патологических процессов в организме, разобраться в этиологических факторах.

Рекомендуемые унифицированные лабораторные методы исследования отвечают определенным требованиям по специфичности, правильности, воспроизводимости, чувствительности, допустимым пределам аналитической погрешности.

Точность и ценность получаемых результатов исследования зависят от многих факторов: выбора метода, подготовки посуды, реактивов, особенно калибровочных материалов, условий взятия, транспортировки, подготовки и хранения образцов биологического или другого материала, использования антикоагулянтов, консервантов, замораживания, оттаивания при его подготовке, работы приборов, качества и добросовестности выполнения анализа. При исследовании учитывают однородность групп животных, их возраст, пол, клиническое состояние, время взятия образца и целый ряд экзогенных факто-

ров (условия кормления, климат, температуру и влажность среды, возможное воздействие химических и биологических средств и т. д.).

Введение в практику унифицированных методов исследования упорядочивает работу лаборатории и отдельных исследователей, делает сопоставимыми результаты различных учреждений и отдельных исследователей, способствует совершенствованию лабораторного дела в целом.

В настоящей книге обобщены клинические лабораторные методы исследования, применяемые в ветеринарии; представлен перечень наиболее информативных показателей для оценки состояния обмена веществ и диагностики различных заболеваний животных; описаны методы подготовки посуды, реактивов, образцов крови, мочи, молока, содержимого рубца к анализам; изложены общие принципы работы основных лабораторных приборов и правила их эксплуатации.

СОКРАЩЕНИЯ, ПРИНЯТЫЕ В СПРАВОЧНИКЕ

АлАТ — аланинаминотрансфераза
АОА — антиокислительная активность
АсАТ — аспартатаминотрансфераза
АТФ — аденозинтрифосфат
БАВ — биологически активные вещества
ГГТ (ГГФ) — гамма-глутамилтранспептидаза (гамма-глутамилтрансфераза)
ГЖХ — газожидкостная хроматография
ДДВФ — диметилдихлорвинилфосфат
КК — креатинкиназа
КФК — концентрационный фотоколориметр
ЛДГ — лактатдегидрогеназа
ЛП — липопротеиды
ЛПВП — липопротеиды высокой плотности
ЛПЛ — липопротеидовая липаза
ЛПНП — липопротеиды низкой плотности
ЛПОНП — липопротеиды очень низкой плотности
МДУ — максимально допустимый уровень
НАД — никатинамидадениндинуклеотид
НЭЖК — неэтерифицированные жирные кислоты
ОЭ — обменная энергия (коэффициент)
ПОЛ — перекисное окисление липидов
ПХ — пероксидаза хрена
ТДФ — тиаминдифосфат
ТМБ — тетраметилбензидин
ТСХ — тонкослойная хроматография
ТТГ — тиротропный гормон
ХМ — хилимикрон
ФЛ — фосфолипиды
ЦТК — цикл трикарбоновых кислот

ГЛАВА 1

ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АППАРАТУРЫ В ЛАБОРАТОРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

В клинической лабораторной диагностике чаще всего применяют приборы двух групп: 1) для оптических измерений (оптоэлектрические); 2) для электрохимических измерений. Во всех случаях аппаратура, предназначенная для получения количественного результата, должна проходить метрологический контроль.

К приборам первой группы относятся приборы, применяемые для различных измерений:

светопоглощения (абсорбции света) — колориметры и спектрофотометры;

флуоресценции — флуориметры и спектрофлуориметры;

оптической активности растворов (вращение плоскости поляризации света) — поляриметры;

интенсивности светоизлучения (интенсивности окраски пламени, эмиссии) — пламенные фотометры;

поглощения света раскаленными газами — атомные абсорбциометры;

светорассеяния (мутные суспензии и эмульсии — нефелометры и турбидиметры).

К приборам второй группы относятся:

различные типы потенциометров, включая pH-метры;

полярографы;

приборы для измерения показателей кислотно-щелочного состояния;

группа устройств (датчиков с терминалами) для непрерывного контроля таких параметров внутренней среды организма, как pO_2, глюкозы и т. д.

Отдельной группой стоят более сложные приборы, совмещающие две функции: препаративную и измерительную. К таким аппаратам относятся хроматографы и приборы для электрофореза.

Во многих лабораторных измерительных устройствах имеются приспособления для облегчения работы лаборанта. В некоторых из них эти устройства доведены до уровня *автоматических анализаторов*. Последние могут быть или непрерывными, или дискретными. Непрерывный автоматический анализатор обрабатывает все

пробы, как на конвейере, дискретный — сериями. В обоих случаях автоматические анализаторы оборудованы компьютерами.

Колориметры, спектрофотометры и турбидиметры работают по одинаковому принципу — принципу фотометрии: сравнению интенсивности падающего на кювету света с измеряемым образцом (раствором, суспензией, эмульсией) с интенсивностью света, прошедшего через кювету. В нефелометрах используется сравнение интенсивностей падающего и рассеянного («вбок», вследствие эффекта Тиндаля) света. Для сравнения используют либо отношение интенсивностей, либо десятичный логарифм их отношения. Современные фотометры могут быть предназначены как для работы в области видимой части оптического спектра (400—700 нм), так и для УФ — ультрафиолетовой (200—400 нм) и ИК — инфракрасной (700—3000 нм).

1.1. КОЛОРИМЕТРЫ

Наиболее просты по конструкции и правилам эксплуатации колориметры — приборы, предназначенные для измерения интенсивности окраски растворов и решения некоторых близких задач. При фотометрировании цветных растворов в диапазоне оптических плотностей, не превышающих 2 (иногда 0,4), оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации окрашивающего раствор вещества.

Во всех современных колориметрах используется фотоэлектрическая регистрация интенсивности света, прошедшего через кювету с образцом, поэтому их называют фотоэлектроколориметрами (ФЭК) или концентрационными фотоколориметрами (КФК). В большинстве случаев фотоэлектроколориметры оборудованы комплектом сменных светофильтров, что позволяет проводить измерения в широком диапазоне фиксированных значений длин волн света падающего на кювету с образцом. Возможность выделения нужного участка спектра в некоторых колориметрах решена путем использования широкополосных светофильтров, в других — узкополосных — интерференционных (10—20 нм).

Фотоэлектрический сигнал с фотодетекторов через усилитель обычно поступает либо на аналоговый терминал (показывающий стрелочный прибор), либо на цифровой; во многих современных колориметрах также предусмотрена возможность сопряжения с цифровым вольтметром, аналоговым регистрирующим прибором (самописцем), цифропечатающим устройством (ЦПУ), а также с ПЭВМ. В последнем случае в позициях каталога, соответствующих таким приборам, указывается «с RS-232-интерфейсом». Обычно дополнительные регистрирующие устройства используют в тех случаях, когда требуются кинетические измерения.

Для сравнения интенсивностей падающего и прошедшего света используют сравнение интенсивностей света, прошедшего через

кювету с образцом (I) и кювету сравнения (I_0), в которой находится чистый растворитель. Кюветы, разумеется, должны быть идентичны. Поэтому сами измерения сводятся к тому, что сначала под луч света помещают кювету сравнения и специальными органами регулировки добиваются значения сигнала, соответствующего 100 % шкалы прибора. Затем под луч помещают исследуемый образец, и в этом случае показание прибора уже соответствует величине пропускания контролируемого раствора (T, %), т. е.

$$T = \frac{I}{I_0} \cdot 100.$$

Во многих случаях аналоговые терминалы снабжены второй шкалой, оцифрованной не в процентах, а в единицах оптической плотности (D). Оптическая плотность с пропусканием связана соотношением

$$D = -\lg (T).$$

Разумеется, здесь пропускание выражается не в процентах, а в виде десятичной дроби. С концентрацией поглощающего вещества при условии, что в растворе нет других веществ, поглощающих в той же спектральной области, оптическая плотность связана соотношением

$$D = KC,$$

где K — коэффициент пропорциональности, зависящий от размеров кюветы и свойств поглощающего вещества; C — молярная концентрация.

Поэтому для количественного анализа колориметрическим методом (точнее фотометрическим, так как измерения могут проводиться в ультрафиолетовой или ближней инфракрасной областях, где никакой видимой окраски нет) удобнее пользоваться калибровочными графиками, заранее построенными с помощью колориметроэталонных растворов.

При определении светофильтра для колориметрии окрашенного раствора следует выбирать такую длину волны падающего света, которая соответствует максимальному поглощению пигмента. Можно воспользоваться таблицей 1. При работе с растворами, поглощающими в ультрафиолетовой или инфракрасной областях, данные таблицы 1 непригодны и следует руководствоваться либо готовой методикой, либо предварительным экспериментальным поиском подходящей спектральной области. При этом следует учитывать, что при работе в области длин волн ниже 340 нм обычные стеклянные кюветы непригодны и необходимы кюветы из специальных сортов стекла (увиолевые) или кварцевые.

Наиболее распространены отечественные колориметры КФК-2 — однолучевой, с аналоговым терминалом, дополнительным выходом для подключения цифрового вольтметра и КФК-3, отличающийся от КФК-2 цифровым терминалом, выходом для подключения

1. Длины волн спектра и соответствующие им окраски

Длина волн поглощаемого света, нм	Цвет поглощаемого излучения	Дополнительный цвет (наблюдаемый цвет раствора)
400—480	Фиолетовый	Желто-зеленый
435—480	Синий	Желтый
490—500	Сине-зеленый	Красный
500—560	Зеленый	Пурпурный
560—580	Желто-зеленый	Фиолетовый
580—595	Желтый	Синий
595—605	Оранжевый	Зеленовато-синий
605—730	Красный	Сине-зеленый
730—760	Пурпурный	Зеленый

ЦПУ и монохроматором вместо набора сменных светофильтров. Оба колориметра работают в диапазоне от 315 до 980 нм. Используют также различные импортные колориметры всех типов.

1.2. СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ

Спектрофотометрия применяется не только для количественных измерений, но и для задач качественного анализа. Во многих случаях для аналитических целей необходимо установить точное положение максимумов и минимумов в спектре поглощения. В спектрофотометре нужные участки спектра выделяются при помощи поворота специальных стеклянных призм, кварцевых призм, вогнутых зеркал или дифракционных решеток, поэтому можно устанавливать любую длину волны в заданном диапазоне. Многие спектрофотометры оснащены графической регистрацией. В этих случаях предусмотрено плавное автоматическое изменение длины волны. Как правило, такие приборы позволяют полностью автоматически регистрировать спектры поглощения либо на диаграммной ленте, либо на экране монитора компьютера.

Обычно такие приборы либо двухлучевые, либо используют возможности компьютера для введения компенсации на неравномерность поглощения растворителя, находящегося в кювете сравнения. При ручной смене длины волны автоматическая регистрация спектра невозможна, поэтому компенсация на изменение поглощения растворителя при смене длины волны производится также вручную с помощью специальных органов управления. Такие приборы, как правило, однолучевые, а стоимость их намного ниже, чем двухлучевых с автоматической регистрацией спектра.

При «ручной» регистрации спектра или измерении оптической плотности на какой-либо одной длине волны последовательность операций измерения на спектрофотометре не отличается от таковой для колориметра. По кювете сравнения (с чистым растворите-

лем) устанавливают 100 % пропускания шкалы путем изменения чувствительности фотодетектирующей части либо меняя ширину светопропускающей щели. Затем под луч устанавливают кювету с контролируемым образцом и повторяют измерение. Для перемещения кюветы приборы, как правило, оборудуют специальным приспособлением (кареткой).

Важная особенность работы на спектрофотометрах по сравнению с колориметрами — необходимость правильного выбора ширины щели. Шириной щели спектрофотометра определяется ширина выделенного щелью интервала длин волн: чем шире щель, тем шире и спектральный интервал. При слишком широкой щели возможны ошибки за счет прохождения света с длинами волн, соседними с выбранной. В паспорте прибора обычно указаны не только геометрическая ширина щели, но и значения зависимости спектральной ширины щели от геометрической ее ширины при разных длинах волн. В идеальном случае ширина щели не должна превышать 2 нм. Однако это может потребовать слишком узких щелей, при которых интенсивности света может недоставать даже для кюветы сравнения. Также при спектрофотометрии значительные ошибки может вносить мутность объекта вследствие светорассеяния.

На отечественном рынке представлено очень много импортных спектрофотометров, поставляемых, как правило, совместно с компьютером и соответствующим программным обеспечением и пригодных для работы в различных областях спектра. Например, такие, как спектрофотометры фирмы Shimadzu (UV-3101 PC, UV-1601), обладающие очень большими возможностями и очень дорогие. Из отечественных наиболее подходят для задач лабораторного клинического анализа следующие спектрофотометры: СФ-101, работающий в диапазоне 200—1000 нм, с фиксированной шириной щели 5 нм, со встроенным двухстрочным дисплеем; СФ-103 — однолучевой сканирующий спектрофотометр, работающий в диапазоне 190—1100 нм, со встроенным графическим дисплеем; СФ-201 — однолучевой сканирующий спектрофотометр, работающий в диапазоне 190—1100 нм, со встроенным графическим дисплеем, с фиксированной спектральной шириной щели 1,8 нм, управляемый с клавиатуры (или мыши) компьютера. Кроме того, можно еще встретить сравнительно недорогие отечественные спектрофотометры СФ-46 и даже СФ-26, обладающие неплохими оптическими характеристиками и простыми в эксплуатации.

1.3. ФЛЮОРИМЕТРЫ (ЛЮМИНОМЕТРЫ)

Принцип работы флюориметров основан на измерении величины люминесценции — интенсивности излучения некоторых веществ вследствие возбуждения под действием света определенной длины волны, причем длина волны возбуждающего света всегда короче длины волны света излучаемого. Поэтому для возбуждения в люминометрах используют различные источники ультрафиоле-

тового излучения, как правило, достаточно мощные. Свет от источника ультрафиолетового излучения с помощью специальных линз фокусируется на кювете с исследуемым веществом и возбуждает флуоресценцию в растворе, которая с помощью специальных линз фокусируется на фотодетектирующем устройстве. Благодаря работе фотодетектора происходит пропорциональное преобразование светового сигнала в электрический.

В общем случае интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации флуоресцирующего вещества. Однако данное утверждение справедливо лишь для достаточно малых концентраций. При повышении концентрации флуоресцирующего вещества наблюдается ряд эффектов (реабсорбции и экранирующий), благодаря которым зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации испытывает значительные отклонения от линейности. В аналитических процедурах с использованием флуориметрии, также как в фотометрии, применяют калибровочные графики, построенные на основании флуориметрии эталонных растворов.

Область применения приборов довольно широкая — от биохимических аналитических (витаминов, гормонов, ферментов) до микробиологических (определение концентрации микробных тел, связанных с мечеными флуоресцеином антителами) и иммунологических исследований.

Из представленных на отечественном рынке сравнительно недорогих отечественных флуориметров для лабораторных клинических исследований наиболее пригоден анализатор «Флюорат-02» НПП «ДОЗА» модификаций 02-01 и 02-03, работающий в спектральном диапазоне 200—600 нм. Его рабочие области задаются светофильтрами, позволяющими проводить не только флуоресцентный анализ, но и фотометрический, хемилюминесцентный и анализ фосфоресценции.

1.4. ПЛАМЕННЫЕ ФОТОМЕТРЫ

Применяются при количественном элементном анализе. Принцип работы пламенных фотометров основан на изучении окраски пламени при внесении в пламя горелки исследуемого вещества в виде аэрозоля. Окраска пламени, точнее, изменение окраски, обусловлена излучением, сопровождающим переход атомов распыленного в пламени вещества из более высокого энергетического состояния в более низкое. Молекулы солей металлов, попадая в пламя, вследствие высокой температуры распадаются на отдельные ионы, электроны которых непрерывно переходят из одного энергетического состояния в другое, что сопровождается непрерывным излучением и поглощением света. Минимальная температура, необходимая для атомизации и возбуждения, зависит от природы исследуемого элемента, но довольно мало от состава соединения, в который этот элемент входит. Поэтому возможности метода

пламенной фотометрии ограничиваются возможностями создания пламени высокой температуры. При сгорании бытового газа (метан) в воздухе метод позволяет определять содержание лишь легковозбудимых щелочных металлов — лития, калия, натрия. При переходе к высокотемпературному пламени, такому, как водород в кислороде или ацетилен в кислороде, возможности метода значительно расширяются.

Современные приборы для пламенной фотометрии оснащены устройствами дозирования и введения исследуемых растворов в пламя горелки; оптической системой, формирующей луч света, падающий в приемник; электронными усилителями сигнала; блоками индикации или регистрации сигнала; устройствами поджига горелки и др. В некоторых приборах фотоэлектрический сигнал формируется совокупностью устройств таким образом, что его величина становится пропорциональной концентрации исследуемого вещества, а шкала прибора градуирована в единицах концентрации исследуемого вещества.

Наиболее часто в клинических лабораториях пламенную фотометрию используют для определения содержания калия и натрия, тем более что обычные химические методы определения этих элементов сложны и неточны.

На российском рынке на сегодняшний день представлено значительное количество пламенных фотометров различных фирм. Наиболее оптимален для работы диагностической клинической лаборатории отечественный ФПА-02, поставляемый с компрессором.

1.5. АТОМНО-АБСОРБЦИОННЫЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРЫ

Атомная абсорбциометрия используется для количественного определения содержания металлов в растворах. Принцип работы атомных абсорбциометров основан на поглощении ультрафиолетового или видимого излучения атомами газа. Для перевода образца растворенного вещества в газообразное состояние раствор впрыскивают в пламя. В качестве источника излучения применяют лампу с полым катодом из того же металла, что и определяется в данный момент. Спектральная ширина линии, испускаемой источником света, как и линии поглощения того же самого элемента в пламени, порядка 0,001 нм, поэтому мешающее поглощение других присутствующих элементов практически исключено.

Температура пламени, как и в случае пламенной фотометрии, определяется горючей газовой смесью. При определении элементов, образующих труднодиссоциирующие соединения (алюминий, бериллий, кремний, ванадий, молибден), используют высокотемпературное пламя (ацетилен — оксид азота). Для клинической лаборатории в большинстве случаев достаточно воздушно-пропанового пламени.

Фотометры для атомной абсорбции — высокочувствительные приборы, но для каждого определяемого элемента должна быть своя лампа, что конструктивно усложняет прибор.

Как и в пламенном фотометре, в атомно-абсорбционном для распыления используют различные эжекторы. Интенсивность распыления зависит от условий их работы, на что, в свою очередь, влияет вязкость раствора. Поэтому при работе с вязкими, богатыми белком жидкостями, такими, как сыворотка крови, разведение должно быть всегда одним и тем же.

Преимущество атомной абсорбциометрии перед традиционными методами анализа проявляется в полной мере в клинической лаборатории при определении таких микроэлементов, как медь, марганец, цинк, а также при токсикологических исследованиях при определении содержания ртути.

Из представленных на рынке атомно-абсорбционных спектрофотометров можно выделить отечественный «Квант-2А» с пламенной атомизацией и его модификации, отличающиеся комплектацией и другими способами атомизации образца, а также «Аналитик-2000» и «Спираль-17». Однако все приборы весьма дорогие.

1.6. ПОЛЯРИМЕТРЫ

Приборы этой группы применяются для поляриметрического анализа, основанного на измерении угла вращения плоскости поляризации луча света, прошедшего через оптически активную среду.

Многие вещества способны изменять плоскость поляризации поляризованного света, причем угол изменения плоскости поляризации бывает пропорционален концентрации этого вещества. Поляриметры имеют источник света — поляризатор — прозрачную кристаллическую пластинку, пропускающую свет, поляризованный в определенной плоскости; устройство для кювет с анализируемым веществом и анализатор — вторую пластинку, пропускающую поляризованный свет, вращая которую можно измерить угол смещения поляризации в луче света, прошедшем через раствор, по отношению к плоскости исходного луча.

Таким образом, свет проходит через светофильтр, пропускающий только узкий диапазон длин волн, конденсор, формирующий луч, поляризатор, кварцевую пластинку, кювету с анализируемым веществом, анализатор, объектив и окуляр и попадает в глаз исследователя. Вращением регулирующего устройства выравнивается освещенность двух (или иногда трех) полей, наблюдаемых исследователем в объективе. Регулирующее устройство имеет градуировку, по которой определяется угол смещения поляризации и в конечном итоге концентрация вещества.

При вращении анализатора в поляриметрах П-161М и П-161СМ и две наружные части поля освещаются или затемняются в зависимости от угла поворота, а средняя часть поля меняет освещенность в обратном порядке. Показания с оптической шкалы ре-

гистрируют при положении, когда средняя часть поля затемняется одинаково с крайними, а границы полей исчезают. Определение правовращающих веществ на СМ проводится на шкале 0—35°, а левовращающих — от 360 до 325°, при этом угол вращения определяется как разница между 360° и величиной отсчета по шкале. В автоматических поляриметрах «Р 3002 KRUSS» или «Polartronic N H8» никакого вращения анализатора не требуется, все результаты сразу высвечиваются на шкале дисплея, но стоимость этих приборов в 10 раз выше.

Особое место занимают специализированные поляриметры — сахариметры, специально предназначенные для определения содержания сахаров в различных жидкостях. В лабораторной клинической практике широко применяется для анализа глюкозы в моче поляриметр МР-1010, используемый и для выявления фальсификации меда сахаром при ветеринарно-санитарной экспертизе. Чаще всего с этой целью пользуются поляриметрами П-161М и СУ-5.

1.7. РЕФРАКТОМЕТРЫ

Рефрактометры предназначены для определения показателя преломления вещества. В наиболее распространенных среди них (за основу конструкции взяты рефрактометры Аббе и Пульфриха) луч света от зеркала попадает на призму из двух половинок, между которыми помещают слой исследуемого вещества (несколько капель). Поле в окуляре рефрактометра при этом выглядит равномерно освещенным. Поворотом призмы достигается полное внутреннее отражение света от поверхности раздела между нижней половиной призмы и анализируемым веществом, что наблюдается в окуляре появлением темного поля с резко очерченными границами. После этого перекресток нитей в окуляре специальным микрометрическим винтом наводят на границу темного поля, делают отсчет значения n по шкале прибора. В зависимости от типа рефрактометра точность измерения показателя преломления может достигать от 0,0001 до 0,00001.

Рефрактометрический анализ экспериментально довольно прост и широко применяется в технологическом контроле спиртовой и пищевой промышленности для определения содержания сухих веществ в молоке, белков в сыворотке крови при клинических исследованиях, содержания сахара в различных жидкостях. Целесообразно применять его для определения одного какого-либо вещества, показатель преломления которого резко отличается от показателей преломления остальных присутствующих веществ и среды. При проведении анализов по показателю преломления, пользуясь калибровочным графиком, находят содержание определяемого вещества. Некоторые типы промышленных рефрактометров снабжены для удобства работы шкалами, показывающими сразу содержание сахара или сухих веществ.,

Часто данные рефрактометрического анализа используют в ветеринарно-санитарной экспертизе для определения натуральности молока. Метод основан на осаждении белков молока с последующим измерением показателя преломления молочной сыворотки, который зависит от кислотности молока и содержания в нем воды.

Наиболее распространены простые отечественные рефрактометры РЛ-2, РЛ-2М, РПЛ-3М, а также высокоточные рефрактометры-интерферометры ИРФ-454 Б2М, ИРФ-456 «Карат-МТ». Для серийных экспресс-анализов часто применяют погружные рефрактометры.

1.8. АНАЛИЗАТОРЫ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МОЛОКА

В последнее время в лабораториях молочной промышленности получили распространение специализированные приборы контроля соматических клеток молока: индикатор подсчета соматических клеток молока (ИСКМ-1) и анализатор соматических клеток молока («СОМАТОС»). Принцип их действия основан на кондуктометрии — измерениях электропроводности молока на постоянном и переменном токе. Оба прибора практически не требуют предварительной подготовки образцов.

1.9. ПРИБОРЫ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Принцип действия физических приборов, используемых в иммунологии, как правило, базируется на изучении физических характеристик, образующихся в результате взаимодействия антигена с иммуноглобулинами (и некоторых других реакций) макромолекулярных иммунных комплексов. Основной сильно меняющейся в процессе реакции физической характеристикой среды, в которой происходит образование иммунных комплексов, является ее светорассеивающая способность. Поэтому в современном иммунохимическом анализе большое распространение получили методы турбидиметрического и нефелометрического анализов. Оба метода позволяют количественно судить о мутности раствора: либо по количеству рассеянного света, либо по количеству прошедшего света; в первом случае говорят о нефелометрии, во втором — о турбидиметрии.

Турбидиметрическим методом анализа (*турбидиметрией*) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, прошедшего через суспензию или эмульсию, т. е. мутную среду. Интенсивность уменьшается вследствие рассеяния света.

Нефелометрическим методом анализа (*нефелометрией*) называют метод, основанный на измерении интенсивности света, рассеянного мутной средой — суспензией или эмульсией. При отсутствии

поглощения интенсивность рассеянного света пропорциональна числу дисперсных частиц.

Нефелометрия — более чувствительный и надежный метод, позволяющий работать с очень низкими концентрациями преципитата. В силу принципа нефелометрии при отсутствии преципитата в растворе на фотодетектор свет от источника вовсе не попадает и достаточно очень небольшого числа светорассеивающих частиц, чтобы получить резкое возрастание сигнала. Поэтому в настоящее время большое распространение получили сканирующие лазерные нефелометры, специализированные для иммунологических целей. Эти приборы позволяют в автоматизированном режиме измерить мутность иммунологической плашки путем последовательного или параллельного «опроса» состояния содержимого всех лунок. «Опросом» и обработкой результатов управляет ПЭВМ. Наличие в качестве источника света лазера в значительной степени упрощает оптическую часть приборов (нет проблем с фокусировкой луча) и резко повышает чувствительность системы вследствие высокой яркости и отсутствия нагревания раствора лучом.

Турбидиметрические измерения требуют гораздо более высокой концентрации преципитата, так чтобы рассеивалось не менее 20 % падающего света, иначе надежность измерений снижается. С другой стороны, для турбидиметрических измерений не требуется специального прибора, пригоден любой колориметр. Турбидиметрические измерения ведут на самой короткой длине волны, позволяемой конкретным прибором.

1.10. ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА УСТАНОВКИ И ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРИБОРОВ

Отечественные лабораторные приборы и оборудование, а также импортные разрешаются к применению в лабораториях клинической диагностики приказом соответствующего министерства (Минздрав РФ и т. п.), а также Государственным комитетом Российской Федерации по стандартизации и метрологии (ГОСТ-Р).

В процессе эксплуатации измерительные приборы подлежат государственному метрологическому надзору. Периодический контроль измерительной техники проводят путем «поверки» — проверки соответствия приборов паспортным метрологическим характеристикам по категориям стандартных образцов. Стандартные и контрольные образцы имеют следующие категории:

государственные стандартные образцы (ГСО). Утверждаются Госстандартом России, регистрируются в Государственном реестре средств измерений и служат для работы органов государственных метрологических организаций;

отраслевые образцы (ОСО). Утверждаются ведомственными организациями по согласованию с Госстандартом. Их применяют для контроля правильности результатов измерения по всем методикам,

кроме методик, регламентированных государственным стандартом и для градуировки средств измерений;

стандартные образцы предприятий (СОП). Утверждаются так же, как ОСО. Используют их для работ по стандартам предприятий.

Средства измерений проверяют только представители метрологических организаций. Основным документом при этом является техническая эксплуатационная документация, прилагаемая к прибору.

Вновь приобретенный прибор устанавливают представители организации изготовителя, которые проверяют его комплектность по техническим условиям, соответствие внешнему виду и наличие внешних систем индикации, регулировки и контроля. Функциональную способность прибора и метрологическую характеристику выверяют по техническому описанию и стандартным образцам.

Для различных фотометрирующих приборов, у которых метрологическая характеристика выражена в единицах пропускания или оптической плотности, в качестве стандартных образцов служит набор стандартных светофильтров, физическая характеристика которых соответствует значениям принятой градуировки шкал. Для pH-метров используют стандартные образцы буферных растворов (фиксаналы) с фиксированными значениями pH с точностью до 0,01 и специальные приборы, выдающие точные значения ЭДС. Для рефрактометров используют образцы специальных пластин и жидкостей с известным показателем преломления. Для поляриметров в качестве ГСО и ОСО используют образцы пластин с градуировкой поляризации в угловых градусах. Гемоглобинометры, градуированные гемиглобинцианидным методом, калибруются стандартными растворами гемиглобинцианида в ампулах.

Положительные результаты поверки приборов оформляют свидетельством (сертификатом) на право дальнейшей эксплуатации.

1.11. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ЭКСПЛУАТАЦИИ ПРИБОРОВ И ОБОРУДОВАНИЯ

Технической документацией, прилагаемой к каждому устройству или прибору, предусмотрены необходимые меры и условия эксплуатации для обеспечения безопасности персонала, обслуживающего прибор, экологической безопасности прибора, исключения электромагнитных помех в работе. При работе с электроприборами наибольшую опасность представляют поражения электрическим током. Мерами безопасности в этом случае являются заземление приборов и строгое соблюдение инструкции, прилагаемой к прибору. При эксплуатации установок, предусматривающих применение различных газов, возможную угрозу представляют поражения органов дыхания, возникновение взрывоопасных смесей, возгорание.

ГЛАВА 2

ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ И РЕАКТИВОВ

2.1. ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ К АНАЛИЗАМ

Химико-лабораторная посуда для клинических и биологических исследований изготавливается из стекла различных марок в зависимости от назначения. В лабораториях используют посуду:

общего назначения: пробирки, химические стаканы, воронки простые, делительные, плоскодонные колбы, конические колбы Эрленмейера, кристаллизаторы, промывалки, холодильники прямые и обратные, сифоны для переливания жидкостей и др.;

специального назначения: аппарат Киппа, эксикаторы, капельницы, каплеуловители, круглодонные колбы, колбы для определения азота по Кьельдалю, колбы Вюрца, Клайзена и другие для перегонки жидкостей, склянки Тищенко для промывания и высушивания газов, хлоркальциевые трубки и др.;

мерную: мерные колбы, мерные цилиндры, мензурки, пипетки Мора, градуированные пипетки, микропипетки, бюретки и др.

Кроме стеклянной при исследованиях применяют также фарфоровую посуду (стаканы, выпарительные чашки, ступки, тигли, воронки Бюхнера, фарфоровые сетки), высокоогнеупорную посуду, металлическое оборудование (штативы, треноги, зажимы, пинцеты, щипцы, тигли и др.) и инструментарий (ножницы, ножи и др.).

Для соблюдения точности поставленного эксперимента следует освоить технику лабораторных работ, правила обращения с посудой и приборами; правила безопасности при работе в химических лабораториях по одному из специальных руководств.

Особенно большое значение для лабораторных исследований имеет чистота химической посуды: без выполнения этого условия нельзя быть уверенным в точности результата. При мытье посуды необходимо помнить о правилах безопасности в лаборатории, соблюдать большую осторожность при работе с концентрированными растворами щелочей, кислот, окислителей.

В зависимости от степени загрязнения лабораторную посуду моют водой, паром, органическими растворителями (диэтиловый эфир, этанол, ацетон, бензин, четыреххлористый углерод и др.), хромовой смесью, другими моющими средствами. Стеклянная посуда считается чистой, если при ополаскивании водой на стенках не образуется капель и вода стекает тонкой равномерной пленкой.

SDVU Axborot-resurs markazi Inv №

Если посуда не загрязнена смолой, жирами и другими не растворяющимися в воде веществами, ее моют теплой водой, а для удаления остатков твердых загрязнений используют щетки, волосяные ерши, стеклянные палочки с кусочком резиновой трубки, надетой на ее нижний конец. После мытья водопроводной водой посуду обязательно 2—3 раза ополаскивают дистиллированной водой.

Длительным, но эффективным способом является мытье паром. Паром посуду обрабатывают также после предварительного мытья другими способами. В большую колбу (вместимостью 3—5 л) на дно помещают стеклянные капилляры, до половины наливают ее водой, плотно закрывают пробкой, в которую вставлены высокая трубка для вывода пара и воронка для стекания конденсата. На трубку надевают (или укрепляют над трубкой в штативе) предназначенный к мытью сосуд.

К самым эффективным моющим средствам относится хромовая смесь, содержащая два сильных окислителя: H_2SO_4 и $K_2Cr_2O_7$. Хромовая смесь, или «хромпик», — это 5%-ный по массе раствор дихромата (бихромата) калия ($K_2Cr_2O_7$) в концентрированной серной кислоте. Для приготовления хромовой смеси в концентрированную серную кислоту плотностью 1,84 кг/м^3 вносят измельченный порошок дихромата калия и осторожно нагревают в фарфоровой чашке (или фарфоровом стакане) при помешивании стеклянной палочкой до растворения дихромата. На 100 мл концентрированной серной кислоты необходимо 9,2 г кристаллического $K_2Cr_2O_7$. Хромовую смесь хранят в фарфоровой посуде с крышкой.

При мытье хромовой смесью посуду (колбы, стаканы больших размеров) сначала очищают с помощью горячей воды и ерша, затем в каждый сосуд вливают небольшой объем хромовой смеси и, осторожно вращая его, полностью смачивают внутренние стенки. Затем хромовую смесь выливают обратно в ту же емкость, в которой она хранится, посуду тщательно обмывают (7—9 раз) водопроводной водой и ополаскивают 3 раза дистиллированной. Сильно загрязненную посуду моют хромовой смесью 2—3 раза или оставляют стоять с хромовой смесью на несколько часов. Мелкую посуду целиком помещают в фарфоровый сосуд с хромовой смесью и оставляют на 20—30 мин, затем вынимают тигельными щипцами, аккуратно складывают в фарфоровую или эмалированную емкость и ставят под струю теплой воды. После полного удаления остатков хромовой смеси еще раз тщательно ополаскивают отдельно каждый предмет.

Хромовую смесь в лаборатории используют длительное время — до изменения ее цвета из темно-оранжевого в темно-зеленый. С хромовой смесью нужно обращаться очень осторожно, при мытье пипеток и трубок следует пользоваться резиновой грушей. Для большего эффекта посуду моют подогретой до 45—50 °С хромовой смесью. Делают это очень осторожно на горячей водяной бане, или предварительно посуду ополаскивают горячей водой. Посуду после крови,

O'zbekiston-
resurs markazi
Inv № 372511

молока, жира перед обработкой хромовой смесью моют в крепкой (до 40 %) щелочи.

В целях дольшего сохранения окислительных свойств хромовой смеси широко применяют такой способ: химическую посуду моют синтетическими моющими смесями (стиральными порошками), затем каждый предмет не менее 15 раз обмывают (наливая и выливая) водопроводной водой, после чего приступают к мытью хромовой смесью.

Если посуда загрязнена воском, парафином, минеральными маслами, хромовую смесь не применяют, посуду моют паром или органическими растворителями. Смолистые вещества удаляют также 40%-ными растворами щелочей.

Хорошее моющее средство (например, для бюреток) — смесь концентрированной серной кислоты и пергидроля (30%-ный раствор H_2O_2) в объемном соотношении 5 : 1. Она служит также для многократного использования.

Пластиковую посуду для взятия проб крови и других материалов моют синтетическими моющими смесями, затем промывают до 20 раз водопроводной водой и ополаскивают 2—3 раза дистиллированной водой. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки и др.) после снятия упаковки используют без мытья. Для аналитических исследований пластиковую посуду использовать нельзя.

После мытья посуду высушивают на воздухе (на специальной доске с колышками) или в сушильном шкафу.

Многие современные методики исследований содержат сведения о подготовке посуды к данному анализу, в том числе о моющих средствах. Насколько важен фактор чистоты посуды для результатов анализа свидетельствует следующий факт: в одном НИИ по результатам анализа обнаружили лучевую болезнь, что оказалось ошибочным; при детальном разборе анализа выяснилось, что лаборант нарушил методику мытья посуды, вместо синтетической моющей смеси для экономии использовал раствор соды, недостаточно смывая его водой, в результате эритроциты адсорбировались на стенках пробирок, «свидетельствуя» о гемолизе крови.

2.2. ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКТИВОВ И ИХ ОЧИСТКА

По назначению реактивы делят на две основные группы: общеупотребительные и специальные. Общеупотребительные имеются в любой лаборатории: кислоты (соляная, серная, азотная); щелочи (натрия и калия гидроксид, раствор аммиака), оксиды кальция и бария, ряд солей, индикаторы. Специальные реактивы применяют для определенных работ.

По степени чистоты реактивы классифицируют на технические (т.), чистые (ч.) — до 2 % примесей, чистые для анализа (ч. д. а.) — 1 % примесей, химически чистые (х. ч.) — менее 1 % примесей, высокоэталонно-чистые (в. э. ч.) и особо чистые (ос. ч.). Реактивы последних двух групп характеризуются высокой чистотой

(0,01—0,00001 % примесей). Содержание примесей в химических реактивах регламентируется специальной технической документацией — государственными стандартами (ГОСТ), техническими условиями (ТУ), статьями Государственной фармакопеи (ГФ). В практике химического анализа используют реактивы, отвечающие квалификации ч. д. а. и х. ч.

Все применяемые в лаборатории методики должны снабжаться перечнем реактивов с указанием степени чистоты, необходимой для получения точных результатов в данном определении.

Забота о сохранении чистоты реактивов — самое главное правило при работе с ними. Так, просыпанный на стол реактив (неизбежно при этом загрязняющийся) нельзя высыпать в ту же банку, где он хранится. Перед тем как поместить реактив в банку для хранения, ее нужно хорошо вымыть и высушить. Излишки раствора, не использованного в работе, также не рекомендуется выливать обратно в склянку, где он раньше хранился.

Некоторые реактивы при длительном хранении изменяются или даже разлагаются. Такие реактивы перед употреблением очищают для повышения точности определения. При этом предварительно можно проверить чистоту препарата с помощью качественных реакций.

Способ очистки реактива (перегонка, фильтрование, перекристаллизация, экстракция) зависит от свойств очищаемого вещества. В отдельных сложных случаях применяют специальные методы очистки (диализ, осаждение, комплексообразование, образование летучих соединений, зонную плавку, хроматографию, ионный обмен и др.).

При **фильтровании** необходимо добиваться полной прозрачности фильтрата. Если фильтрат мутный, его пропускают повторно или многократно через один и тот же фильтр. Процесс фильтрования зависит от физико-химических свойств веществ, соотношения пор фильтра и размеров твердых частиц, отделяемых от жидкости, и других факторов, поэтому важно правильно подобрать фильтрующий материал. Используют фильтровальную бумагу, асбест, кварцевый песок, адсорбенты (активированный уголь, силикагель, отбеливающие земли и др.), стекловолокно, ткани и т. д.

Фильтровальная бумага выпускается в пачках по 100 шт., нарезанной кругами различного диаметра (55, 70, 90, 110, 125, 150, 240, 320 мм) в зависимости от диаметра воронок. Различают бумажные фильтры обычные и беззольные. На каждой пачке указана масса золы фильтра. Если после запятой стоят четыре нуля (например, масса золы одного фильтра 0,00007 г) — фильтр беззольный; при взвешивании на аналитических весах такая масса золы не скажется на результатах взвешивания после сжигания фильтра. Если после запятой три нуля (например, масса золы одного фильтра 0,0003 г) — это обычная фильтровальная бумага.

Различие фильтров по плотности обозначается цветом бумажной ленты, которой оклеивают упаковку готовых фильтров. Розовая (или черная) лента (диаметр пор 10 нм) — наименее плотные быстропропускающие фильтры; белая лента (3 нм) — фильтры средней плотности, применяемые для отделения большинства кристаллических осадков; синяя лента (1—2,5 нм) — баритовые наиболее плотные и медленно пропускающие фильтры; желтая лента — обезжиренные фильтры. Выбирая размер фильтра, руководствуются не объемом фильтруемой жидкости, а количеством отделяемого осадка — осадок должен заполнить не более половины объема фильтра, иначе возникнут затруднения с его промыванием.

Фильтрование ускоряется под вакуумом и при нагревании. Для фильтрования под вакуумом собирают установку, состоящую из фарфоровой воронки Бюхнера, колбы Бунзена, предохранительной склянки и вакуум-насоса (или водоструйного насоса). При фильтровании взбалтывают смесь жидкости с осадком и наливают ее в воронку до половины высоты. Отсасывание продолжают до тех пор, пока с конца воронки не перестанет капать жидкость. Тогда промывают вещество на фильтре небольшими порциями растворителя, дожидаются прекращения капель из воронки, выключают насос. Воронку вынимают, находящееся в ней вещество выкладывают на лист фильтровальной бумаги вместе с фильтром, подсушивают, фильтр отделяют от еще влажного осадка.

Перед фильтрованием на воронке Бюхнера небольшими порциями растворителя смачивают бумажный фильтр при включенном насосе («присасывают» фильтр) и следят, нет ли свиста, свидетельствующего о прорыве фильтра, затем приступают непосредственно к фильтрованию смеси с осадком. Если смесь охлаждалась в ледяной бане, то растворитель для «присасывания» фильтра и промывания осадка должен быть охлажден в таких же условиях. Если необходимо знать массу осадка, полученного при фильтровании, бумажный фильтр перед вкладыванием в воронку Бюхнера необходимо взвесить, затем взвесить после высушивания отфильтрованное вещество с фильтром и по разности взвешиваний определить массу осадка.

Кроме фильтрования разделение смеси жидкости и твердого вещества проводят в центрифугах. Особенно это удобно для вязких растворов.

Для получения химически чистых веществ применяют **перегонку (дистилляцию) жидкости**. Прибор для перегонки состоит из колбы Вюрца, холодильника и приемника. Перегоняемая жидкость должна занимать не более 2/3 объема колбы. Для облегчения кипения в колбу вносят «кипелки» (стеклянные трубочки, кусочки фарфора, пемзы и др.).

Некоторые твердые вещества — йод, сера, хлорид аммония и др., способные возгоняться (т. е. при нагревании испаряться, минуя жидкое состояние), очищают **возгонкой**, или **сублимацией**. Про-

стейшее устройство для возгонки — стакан, поставленный на песчаную баню и накрытый круглодонной колбой с холодной водой или часовым стеклом с кусочками льда. На холодной поверхности пары конденсируются в кристаллы. Технический йод (6 частей) перед возгонкой смешивают с KI (1 часть) и CaO (2 части) и растирают.

Экстракция — извлечение вещества из раствора другим растворителем, не смешивающимся с первым растворителем. Чаще всего используют органические растворители для извлечения из водных растворов. В основе метода экстракции лежит закон распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, а также различная растворимость отдельных веществ в данном растворителе (если вещество извлекают из смеси с другими веществами). Отношение концентраций растворенного вещества в обеих жидкостях называется коэффициентом распределения.

В простейшем случае экстрагирование из раствора проводят в делительной воронке. Раствор, из которого нужно извлечь вещество, наливают в делительную воронку до половины ее и добавляют подобранный растворитель (например, диэтиловый эфир, петролейный эфир, бензол, бензин, гексан и др.) в объеме половины взятого раствора. Делительную воронку закрывают, одной рукой придерживают пробку, другой — кран, и воронку многократно в течение 15—20 мин перевертывают плавными движениями вверх и вниз, не допуская резкого взбалтывания содержимого, чтобы избежать образования стойких эмульсий. Периодически выравнивают давление, приоткрывая кран в тот момент, когда воронка находится в перевернутом состоянии — краном вверх. По окончании экстракции воронку на некоторое время ставят в высокий стакан или укрепляют в штативе до полного расслоения жидкостей и установления четкой границы между ними. Затем через кран сливают нижний слой жидкости в один сосуд, верхний слой через горло воронки переливают в другой. Иногда экстрагирование повторяют несколько раз. Затем растворитель отгоняют в колбе для перегонки, где и остается вещество. Экстракцию эффективнее всего проводить несколько раз малыми порциями растворителя.

Очистка вещества **кристаллизацией (перекристаллизацией)** из насыщенных растворов основана на неодинаковой растворимости веществ при различных температурах. При некоторой определенной температуре раствор будет насыщенным в отношении одного вещества и ненасыщенным в отношении других веществ — примесей. В то время как первое вещество станет при охлаждении выпадать в осадок, другие будут полностью находиться в растворе.

Перекристаллизация служит для удаления примесей только из кристаллических веществ. Чтобы перекристаллизовать вещество, готовят его насыщенный раствор в небольшом количестве воды (или другого растворителя), нагретой до 90—95 °С. Горячий насыщенный раствор фильтруют через воронку для горячего фильтрования с целью отделения нерастворимых частиц. Фильтрат собирают

в сосуд-приемник, затем охлаждают холодной водой или льдом. При этом очищаемое вещество выкристаллизовывается, а примеси остаются в растворе, поскольку по отношению к ним он не насыщен [точнее, для них не достигнуто соответствующее произведение растворимости (ПР), после превышения которого выпадает осадок]. Кристаллы отделяют от маточного раствора фильтрованием и сушат листами фильтровальной бумаги. Для более тщательной очистки перекристаллизацию повторяют.

Высушивание веществ требует особого внимания. При высушивании на воздухе вещество распределяют тонким слоем и периодически перемешивают, для предохранения от загрязнения его накрывают листом чистой фильтровальной бумаги. Высушивание на воздухе — операция продолжительная. Его используют в том случае, если вещество негигроскопично, если его нужно получить рыхлым, сыпучим или оно разлагается при нагревании. Чаще применяют высушивание в сушильных шкафах при нагревании до 65—110 °С. Сильно гигроскопичные, расплывающиеся на воздухе вещества сушат в эксикаторе, помещая их в открытом бюксе или чашке на фарфоровый вкладыш эксикатора над веществом, энергично поглощающим влагу: кальция хлорид ($CaCl_2$), концентрированная серная кислота (H_2SO_4), фосфора оксид (V) (P_2O_5) и др.

Одна из разновидностей высушивания — п р о к а л и в а н и е. Для получения точных результатов вещество до постоянной массы доводят в эксикаторе. Периодически взвешивают определенное количество вещества вместе с чашкой (тиглем), в которой оно находится. Если результат последнего взвешивания отличается от предыдущего не более чем на ±0,0002 г, считается, что вещество доведено до постоянной массы.

2.3. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ХРАНЕНИЕ ТОЧНЫХ РАСТВОРОВ

Растворы — гомогенные (однородные) системы, состоящие из растворителя, растворенного вещества и продуктов их взаимодействия. Количество или масса вещества, содержащиеся в определенной массе или объеме раствора (или растворителя), называется концентрацией. Раствор, содержащий предельное количество вещества при данной температуре, является насыщенным. При приготовлении насыщенных растворов добиваются, чтобы этот раствор находился в равновесии с осадком: если по мере растворения новых порций вещества наступает момент, когда оно при данной температуре больше не растворяется, а находится на дне сосуда в виде осадка, значит, раствор над осадком стал насыщенным и его концентрация характеризует растворимость вещества в данном растворителе. Обычно при нагревании растворимость вещества увеличивается. Ненасыщенные растворы могут быть разбавленными и концентрированными.

2.3.1. СПОСОБЫ ВЫРАЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРОВ

Способы выражения концентрации растворов различают в зависимости от того, в каких единицах выражают состав раствора: растворенное вещество и раствор (или растворитель). Для аналитических определений чаще всего используют такие способы выражения концентрации, как массовая доля (старое название — процентная концентрация), молярная концентрация (молярность), нормальная концентрация (нормальность) и титр.

Концентрации веществ в крови, плазме, сыворотке выражают в г% (число граммов вещества в 100 мл субстрата), мг% (число миллиграммов вещества в 100 мл), мкг% (число микрограммов вещества в 100 мл), ммоль/л (миллимоль/л, 10^{-3}), мкмоль/л (микромоль/л, 10^{-6}), нмоль/л (наномоль/л, 10^{-9}). (В приложении 4 приведены коэффициенты пересчета этих единиц. Числовое значение в старых единицах умножают на коэффициент пересчета и получают числовое значение в рекомендуемых единицах СИ.)

Массовая доля — это отношение массы вещества к массе раствора. Выражается: а) в долях единицы, б) в процентах:

$$\text{а)}\ \omega_в = m_в/m_р;$$

$$\text{б)}\ \omega_в = (m_в/m_р) \cdot 100,$$

где $\omega_в$ — массовая доля вещества; $m_в$ — масса вещества; $m_р$ — масса раствора.

Например, если в 500 г раствора содержится 20 г вещества, то $\omega_в = 20/500 = 0{,}04$ или $\omega_В = (20/500)100 = 4$ %.

Массовая доля показывает, сколько граммов вещества содержится в 100 г раствора. Например, 25%-ный раствор означает, что в каждых 100 г раствора содержится 25 г вещества и 75 г растворителя.

В старых руководствах массовая доля иногда выражена в промилле (‰):

$$\omega_в = (m_в/m_р) \cdot 1000.$$

Масса раствора складывается из массы растворенного вещества и массы растворителя. Поэтому, если раствор готовили, например, смешиванием 30 г вещества и 250 мл (250 г) воды, то массовая доля вещества в этом растворе равна:

$$\omega_в = m_в/m_в + m_р \text{ или } \omega_в = (30/30 + 250) \cdot 100 = 10{,}7\ \%.$$

Поскольку жидкости отмеривают обычно по объему, необходимо пользоваться плотностью раствора.

Плотность раствора (или жидкости) показывает массу единицы объема. Плотности многих жидких веществ, а также плотности растворов широко употребимых кислот, оснований, солей приведены в справочниках. Плотность выражают в г/см^3 (г/мл), кг/м^3, кг/см^3.

Если плотность некоторого раствора равна 1,24 г/см^3, следовательно, 1 см^3 (1 мл) данного раствора имеет массу 1,24 г. Плот-

ность (ρ), масса (m) и объем (V) раствора (жидкости) связаны между собой соотношением

$$\rho = m/V; \text{ соответственно } m = V\rho; \; V = m/\rho.$$

Плотность воды равна 1 г/см^3, поэтому для воды ее объем численно равен ее массе. В лабораторной практике плотность разбавленных растворов различных веществ приближенно принимают равной 1 г/см^3. Плотности растворов можно измерять специальными приборами — *ареометрами*.

Способ выражения концентрации раствора в массовых долях применяют для приготовления приблизительных растворов, при этом вещества взвешивают на технических лабораторных весах с точностью до десятых и сотых долей.

При приготовлении точных растворов используют молярную, нормальную концентрацию и титр; расчеты ведут с точностью до 4-го знака после запятой, навески веществ отвешивают на аналитических весах.

Встречается также вид концентрации **объемная доля** (φ) — отношение объема вещества к объему раствора; обычно используется для газов:

$\varphi = V_в/V_р$ — выражена в долях единицы;

$\varphi = (V_в/V_р)100$ — выражена в процентах.

Молярная концентрация, или молярность, — это отношение количества вещества растворенного соединения к объему раствора; выражается в моль/л.

$$c_в = n_в/V_р,$$

где $c_в$ — молярная концентрация вещества, моль/л; $n_в$ — количество вещества (число молей вещества); $V_р$ — объем раствора, л.

Количество вещества иногда изображают символом ν (ню).

Молярная концентрация показывает, сколько молей вещества содержится в 1 л раствора. Записи c(NaOH) = 1 моль/л и 1 М NaOH равноценны и означают, что в 1 л раствора содержится 1 моль NaOH. Раствор, содержащий 1 моль вещества в 1 л, называется одномолярным, 0,5 моль в 1 л — полумолярным, 0,1 моль в 1 л — децимолярным, 0,01 моль в 1 л — сантимолярным. Например, одномолярный раствор серной кислоты содержит 98 г H_2SO_4 в 1 л раствора, децимолярный — 9,8 г H_2SO_4 в 1 л раствора.

Масса одного моля вещества есть его молярная масса (M), численно равная относительной молекулярной массе вещества (Mr). Относительные молекулярные массы веществ складываются из относительных атомных масс элементов, составляющих вещество, и могут быть рассчитаны по периодической системе химических элементов. Относительные молекулярные массы безразмерны, молярные массы измеряются в г/моль.

$Mr(H_2SO_4) = 98$, $M(H_2SO_4) = 98$ г/моль;

Mr(NaOH) = 40, M(NaOH) = 40 г/моль.

Точные молярные массы веществ приводятся в химических справочниках.

Количество вещества связано с массой вещества и его молярной массой соотношением $n = m/M$.

Поэтому для расчета молярной концентрации удобно пользоваться формулой $c = m/MV$. Например, при растворении 15 г NaOH в 600 мл раствора его молярная концентрация в растворе будет равна: $c(NaOH) = 15/40 \cdot 0{,}6 = 0{,}625$ моль/л.

Нормальная концентрация в современной химической литературе называется эквивалентной концентрацией, или молярной концентрацией эквивалента.

Нормальная концентрация — это отношение количества вещества эквивалента растворенного соединения к объему раствора. Показывает число эквивалентных масс вещества в 1 л раствора, выражается в моль/л:

$$c_{(1/z\,x)} = n_{(1/z\,x)}/V,$$

где $c_{(1/z\,x)}$ — нормальная концентрация; $n_{(1/z\,x)}$ — количество вещества эквивалента, моль; V — объем раствора, л.

Эквивалент — условная частица, т. е. такая часть $(1/z)$ молекулы вещества, которая содержит в своем составе один атом (ион) водорода или реагирует с ним. В пересчете на 1 моль вещества это будет часть молярной массы вещества, рассчитанная с учетом фактора эквивалентности $f = 1/z$. Фактор эквивалентности вещества A выражают записью: $f_{экв}(A)$ или $f(1/z\,A)$.

Например, молекула HCl содержит 1 атом H, условная частица — молекула HCl, фактор эквивалентности HCl $f_{экв}(HCl) = 1$. Эквивалентная масса равна молярной массе: $M(1/z\ HCl) = M(HCl) = 36{,}5$ г/моль. Молекула H_2SO_4 содержит 2 атома H, в реакциях с получением средних солей она выделяет 2 атома H:

$$H_2SO_4 + 2NaOH = Na_2SO_4 + 2H_2O.$$

Условная частица равна половине молекулы H_2SO_4, фактор эквивалентности $f(1/z\ H_2SO_4) = 1/2$, эквивалентная масса

$$M(1/z\ H_2SO_4) = M(1/2\ H_2SO_4) = 49 \text{ г/моль}.$$

В реакциях с получением кислых солей H_2SO_4 выделяют один атом H, для таких реакций $f_{экв}(H_2SO_4) = 1$, эквивалентная масса равна 98 г/моль:

$$H_2SO_4 + NaOH = NaHSO_4 + H_2O.$$

Гидроксид натрия (NaOH) в обменных реакциях реагирует своей группой OH с одним атомом H, условная частица — молекула NaOH, $f_{экв}(NaOH) = 1$, эквивалентная масса равна 40 г/моль. Для солей, оксидов условную единицу отождествляют с одним атомом одновалентного металла, способным вытеснить из кислот один атом H. Поэтому их фактор эквивалентности учитывает степень

окисления металла и число его атомов в соли, оксиде (в случае полного обмена):

$$(Al^{+3})_2(SO_4)_3\ f_{экв} = 1/3 \cdot 2 = 1/6;\ (Cr^{+2})_2O_3\ f_{экв} = 1/3 \cdot 2 = 1/6;\ Fe^{+2}(NO_3)_2\ f_{экв} = 1/2 \cdot 1 = 1/2.$$

В реакции $Na_2CO_3 + HCl = NaCl + NaHCO_3$ фактор эквивалентности карбоната натрия равен 1, так как в обмене участвует один атом Na; $f_{экв}(Na_2CO_3) = 1$.

Итак, в общем случае в кислотно-основных реакциях эквивалент — условная единица, которая в данной реакции соединяется с одним ионом водорода или замещает, высвобождает его, или каким-то другим образом равноценна ему.

Растворы с нормальной концентрацией обозначаются 0,1 н., 1 н., 2,5 н. и т. д. Например, однонормальные растворы кислот и оснований содержат следующие эквивалентные массы для реакций полного обмена с получением средних солей:

$$M(KOH) = 56 \text{ г/моль};\ M[1/2\ Ca(OH)_2] = 74/2 = 37 \text{ г/моль};$$

$$M(1/2\ H_2SO_4) = 98/2 = 49 \text{ г/моль};\ M(1/3\ Al(OH)_3) = 78/3 = 26 \text{ г/моль};$$

$$M(1/3\ H_3PO_4) = 98/3 = 32{,}64 \text{ г/моль}.$$

Расчет навески вещества в граммах (m) для приготовления растворов с нормальной концентрацией проводят аналогично молярной концентрации по формуле

$$c_{(1/z\,x)} = n_{(1/z\,x)}/V,\ c_{(1/z\,x)} = mM(1/zx)V.$$

Отсюда

$$m_в = c_{(1/zx)}M(1/z)V,$$

где $M(1/z\,x)$ — эквивалентная масса вещества; $c_{(1/z\,x)}$ — нормальная концентрация; V — объем раствора, л.

Для окислительно-восстановительных реакций за основу взяты окислительно-восстановительные превращения:

$$H^+ + e = H^0,\ H^0 - e = H^+.$$

Поэтому факторы эквивалентности окислителей и восстановителей зависят от числа электронов, принятых или отданных одной молекулой вещества. Так, для перманганата калия, имеющего различные переходы в разных средах, фактор эквивалентности и эквивалентные массы будут различны:

а) кислая среда $KMn^{7+}O_4 + 5e \rightarrow Mn^{2+}$:

$$f_{экв}(KMnO_4) = 1/5,\ M(1/5\ KMnO_4) = 158/5 = 31{,}6 \text{ г/моль};$$

б) нейтральная среда $KMn^{7+}O_4 + 3e \rightarrow Mn^{4+}O_2$:

$$f_{экв}(KMnO_4) = 1/3,\ M(1/3\ KMnO_4) = 158/3 = 52{,}67 \text{ г/моль};$$

в) щелочная среда $KMn^{7+}O_4 + 1e \rightarrow K_2Mn^{6+}O_4$:

$$f_{экв}(KMnO_4) = 1,\ M(KMnO_4) = 158 \text{ г/моль}.$$

В химических справочниках даются точные значения молекулярных (молярных) и эквивалентных масс наиболее употребительных веществ (см. приложение 3), но по вышеприведенным правилам эквивалентные массы рассчитать нетрудно и без справочника.

Поскольку вещества реагируют пропорционально их эквивалентам, 1 экв. щелочи всегда прореагирует без остатка с 1 экв. кислоты, 10 экв. щелочи — с 10 экв. кислоты и т. д. Поэтому нормальная концентрация раствора — самая удобная для титрования, так как титрование основано на реакциях взаимодействия веществ. Число эквивалентов для раствора вещества заключено в произведении нормальной концентрации раствора на взятый объем: $c_{(1/z\,x)}V$. Если два раствора прореагировали без остатка, то $c_{(1/z\,x)1}V_1 = c_{(1/z\,x)2}V_2$. Эта формула отражает закон кратных отношений для растворов.

Титр показывает массу вещества, содержащуюся в 1 мл раствора. Если, например, в 10 л раствора растворено 5,843 г серной кислоты, то титр этого раствора

$$T = 5{,}843/10\,000 = 0{,}0005438 \text{ г}.$$

Зная титр, можно рассчитать нормальность, и наоборот:

$$T = [c(1/z\,x)M(1/z\,x)]/1000;\ c(1/z\,x) = (T \cdot 1000)/M(1/z\,x).$$

В лаборатории чаще употребляют децинормальные растворы, их титры выражаются очень малыми числами: например, для 0,1 н. раствора HCl

$$T = [c(1/z\,x)M(1/z\,x)]/1000 = (0{,}1 \cdot 36{,}5)/1000 = 0{,}00365 \text{ г}.$$

Поэтому выражение «титрованный раствор» означает, что концентрация этого раствора известна с большой точностью.

Техника приготовления приблизительных и точных растворов различна. Приблизительные растворы готовят в бутылях и склянках, точные растворы — в мерных колбах. Если точный раствор готовят из навески, ее отвешивают на аналитических весах в бюксе, затем вносят в мерную колбу через сухую воронку небольшими порциями; обмывают бюкс несколько раз небольшими порциями дистиллированной воды, чтобы навеска была внесена количественно — без остатка. Воронку затем также обмывают несколько раз дистиллированной водой. Растворитель в мерную колбу наливают сначала до половины ее объема и добиваются полного растворения навески, помешивая раствор круговыми движениями колбы и встряхиванием, после чего полученный раствор дополняют растворителем до метки и тщательно перемешивают (закрыв колбу пробкой и многократно переворачивая ее, поддерживая дно и пробку).

При доведении объема раствора до метки последние порции растворителя нужно вносить очень осторожно, по каплям, пока нижний мениск не достигнет уровня метки.

Если раствор в мерной колбе готовят не из навески, а из более концентрированного раствора, порядок операции тот же: внесение концентрированного раствора (с помощью пипетки), разведение, перемешивание, доведение объема в колбе до метки, перемешивание.

Готовя растворы в мерной колбе, рассчитывают навеску твердого вещества или объем концентрированного раствора, учитывая объем колбы и требуемую концентрацию приготовленного раствора. Стандартные объемы мерных колб 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 и 2000 мл. Полученный в мерной колбе раствор проверяют титрованием, чтобы установить его точную концентрацию. Если растворы в мерной колбе только разбавляют (в 10, 100 раз и т. д.), то полученные разбавленные растворы уже не титруют. Так, для получения 0, 01 н. раствора из 0,1 н. раствора в мерную колбу на 100 мл вносят пипеткой Мора 10 мл 0,1 н. раствора и доводят объем водой до метки. Путем последовательного разбавления делают серии стандартных растворов для колориметрии, флуориметрии, нефелометрических определений и т. д. Стандартные растворы обычно готовят непосредственно перед применением.

Для быстрого приготовления точных растворов кислот, щелочей и некоторых солей удобно пользоваться фиксаналами (стандарт-титрами) — точно отвешенными и содержащими в запаянных ампулах количествами веществ, необходимыми для приготовления 1 л 0,1 н. или 0,01 н. раствора. На ампуле указано, какое вещество и в каком количестве в ней находится. Выпускают фиксаналы в коробках по 10 ампул. Для приготовления растворов сначала теплой водой смывают надпись на ампуле и тщательно обтирают ее. В мерную колбу на 1 л вставляют воронку со стеклянным бойком, острый конец которого обращен вверх, и ампулу осторожно разбивают о боек, давая содержимому вытечь. Затем, не изменяя положения ампулы, ее обильно промывают дистиллированной водой, после чего удаляют, а раствор доливают до мерки и перемешивают (закрыв колбу пробкой). Кроме жидких существуют и сухие фиксаналы. В этом случае необходимо, чтобы воронка была сухая.

Выпускают фиксаналы серной кислоты (H_2SO_4), соляной кислоты (HCl), гидроксида натрия (NaOH), гидроксида калия (KOH), карбоната натрия (Na_2CO_3), гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$), хлорида натрия (NaCl), хлорида калия (KCl), щавелевой кислоты ($H_2C_2O_4$), оксалата натрия (щавелевокислого натрия — $Na_2C_2O_4$), оксалата калия ($K_2C_2O_4$), оксалата аммония [$(NH_4)_2C_2O_4$], хромата калия (K_2CrO_4), дихромата калия ($K_2Cr_2O_7$), тиосульфата натрия (гипосульфита натрия — $Na_2S_2O_3$), перманганата калия ($KMnO_4$), роданида натрия (роданистого натрия — NaSCN), роданида калия (KSCN), роданида аммония (NH_4SCN), нитрата серебра ($AgNO_3$), йода (I_2), тетрабората натрия (буры — $Na_2B_4O_7$), хлорида бария ($BaCl_2$) и др.

Неиспользованный раствор в мерной колбе тотчас же переливают в склянку для хранения, а колбу моют. Чистую пришлифован-

ную пробку обертывают чистой фильтровальной или писчей бумагой и закрывают ею пустую колбу (перед употреблением бумагу снимают). Если пробка резиновая, а приготовленный точный раствор (например, йода) может оказывать химическое действие на резину, пробку следует обернуть полиэтиленовой или тефлоновой пленкой.

При длительном хранении растворов в стеклянной посуде растворимые части стекла переходят в раствор и реакция последнего меняется. Чтобы избежать этого, стеклянную посуду предварительно выщелачивают длительным пропусканием пара. При особо точных и ответственных анализах необходимо принимать во внимание возможность выщелачивания стекла и применять кварцевую посуду или посуду из стекла, не содержащего определенный элемент. Щелочные растворы нельзя долго хранить в фарфоровой и особенно в стеклянной посуде.

Если точным раствором приходится пользоваться часто, готовят большой объем его при тщательном перемешивании, оттитровывают и хранят в бутылях, снабженных бюретками. При хранении следят, чтобы в раствор не попадали влага, пыль, углекислота и т. п. С этой целью бутыли снабжают хлоркальциевыми трубками с поглотителями (для кислот трубку заполняют хлоридом кальция или ватой, для щелочей — натронной известью).

При хранении некоторые растворы недостаточно стойки, они могут выделять осадки, изменяться под действием света, кислорода воздуха, примесей, содержащихся в воздухе, и т. д. Поэтому точные растворы периодически проверяют титрованием.

2.3.2. РАСЧЕТЫ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ МОЛЯРНЫХ РАСТВОРОВ

Приготовление 0,1 М (моль/л) раствора нитрата серебра. Подсчитывают (или берут в справочнике) молярную массу $AgNO_3$, она равна 169,875 г/моль:

$$c = m/(MV);\ m = cMV = 0{,}1 \cdot 169{,}875 \cdot 1 = 16{,}9875 \text{ г}.$$

Отвешивают 16,9875 г соли и растворяют в мерной колбе объемом 1 л. Чтобы исключить многократное отсыпание и досыпание вещества при взвешивании, берут близкую к рассчитанной величине навеску, а затем рассчитывают концентрацию раствора. Например, навеска составила 16,9683 г:

$$16{,}9875 \text{ г} — 0{,}1\ M$$

$$16{,}9683 \text{ г} — x,$$

$$x = 16{,}9683 \cdot 0{,}1/16{,}9875 = 0{,}09989 \text{ М (моль/л)}.$$

Если нужно приготовить другой объем раствора, делают соответствующий расчет. Например, нужно приготовить 250 мл раствора:

$$m = cMV = 0{,}1 \cdot 169{,}875 \cdot 0{,}25 = 4{,}2469 \text{ г}.$$

Отвешивают 4,2469 г $AgNO_3$, вносят в мерную колбу на 250 мл и готовят раствор по правилам, приведенным выше.

2.3.3. РАСЧЕТЫ ПРИ ПРИГОТОВЛЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ РАСТВОРОВ

Приготовление раствора нормальной концентрации из кристаллического вещества. Например, нужно приготовить 250 мл 0,1 н. раствора $K_2Cr_2O_7$ из кристаллического дихромата калия. В окислительно-восстановительных реакциях хром(VI) переходит в хром (III) и молекула $K_2Cr_2O_7$ принимает 6 электронов: $K_2(Cr^{6+})_2O_7 + 6e \rightarrow 2Cr^{3+}$.

$$f_{экв}(K_2Cr_2O_7) = 1/6,\ M(1/6\ K_2Cr_2O_7) = 294,22/6 = 49,04\ г/моль.$$

$$m(K_2Cr_2O_7) = M(1/6\ K_2Cr_2O_7)c(1/6\ K_2Cr_2O_7)V = 49,04 \cdot 0,1 \cdot 0,25 = 1,226\ г.$$

1,226 г $K_2Cr_2O_7$ отвешивают (на аналитических весах), растворяют в мерной колбе на 250 мл дистиллированной водой, доводят объем до метки, тщательно перемешивают.

Следует иметь в виду, что многие кристаллические вещества представляют собой кристаллогидраты. В этом случае эквивалент рассчитывают с учетом кристаллизационной воды. Например, для щавелевой кислоты, которая в окислительно-восстановительных реакциях окисляется до CO_2:

$$H_2C_2O_4 - 2e \rightarrow 2CO_2 + 2H^+,$$

$$f_{экв}(H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O) = 1/2;\ M(1/2\ H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O) =$$

$$= 126,07/2 = 63,033\ г/моль.$$

Приготовление растворов нормальной концентрации из концентрированных растворов. Следует приготовить 0,1 н. раствор H_2SO_4 из концентрированной кислоты, имеющейся в лаборатории. Проведем расчеты для 1 л 0,1 н. раствора H_2SO_4.

Ареометром измеряют плотность концентрированной H_2SO_4. Для этого кислоту наливают в высокий стеклянный цилиндр и подбирают соответствующий ареометр, с тем чтобы он плавал в кислоте, не касаясь дна и стенок цилиндра. Деление на шкале ареометра, против которого устанавливается верхний край мениска кислоты, соответствует значению плотности раствора в г/см^3 (кг/м^3). (После применения ареометр обмывают водой, обтирают и убирают в футляр.) По справочным таблицам находят концентрацию раствора. Например, оказалось, что в растворе содержится 95,6 % H_2SO_4, а плотность кислоты 1,84 г/м^3. Рассчитывают, какую массу H_2SO_4 необходимо взять для приготовления 1 л 0,1 н. раствора H_2SO_4:

а) $f_{экв}(H_2SO_4) = 1/2$

$$M(1/2\ H_2SO_4) = 98,078/2 = 49,039\ г/моль,$$

$$m(H_2SO_4) = M(1/2\ H_2SO_4)c(1/2\ H_2SO_4)V = 49,039 \cdot 0,1 \cdot 1 = 4,9039\ г;$$

б) учитывая, что концентрированная серная кислота имеет массовую долю 95,6 % H_2SO_4 в растворе, рассчитывают, какая масса этого раствора будет содержать 4,9039 г H_2SO_4:

100 г раствора — 95,6 г H_2SO_4

x г раствора — 4,9039 г H_2SO_4,

$x = 100 \cdot 4{,}9039/95{,}6 = 5{,}1296$ г раствора концентрированной H_2SO_4;

в) найдем объем этого раствора:

$$V = m/\rho = 5{,}1296 \text{ г}/1{,}84 \text{ г/мл} = 2{,}79 \text{ мл}.$$

В мерную колбу объемом 1 л вольем некоторый объем дистиллированной воды, затем внесем туда градуированной пипеткой 2,8 мл 95,6%-ной серной кислоты, растворяем, помешивая круговыми движениями колбу, затем доводим объем до метки и тщательно перемешиваем. Полученный раствор оттитровываем раствором щелочи.

2.3.4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ С ЗАДАННОЙ МАССОВОЙ ДОЛЕЙ ВЕЩЕСТВ

Приготовление растворов из кристаллических веществ. *Пример*: рассчитать массу воды и сульфита натрия (Na_2SO_3) для приготовления 5 л 10%-ного раствора (плотностью 1,075 г/см^3).

Решение: масса 5 л полученного раствора составит $5000 \cdot 1{,}075 = 5357$ г. В этом растворе должно содержаться 10 % вещества (приведены два варианта расчета — а и б):

а) в 100 г раствора содержится 10 г Na_2SO_3;

в 5357 г — x

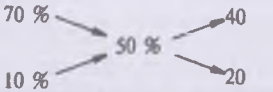
$x = (5357 \cdot 10)/100 = 537{,}5$ г Na_2SO_3;

б) $m_в = m_р \cdot \omega_в = 5357 \cdot 0{,}1 = 535{,}7$ г Na_2SO_3.

Масса воды составит $5000 - 537{,}5 = 4462{,}5$ г. Таким образом, для приготовления заданного раствора необходимо взять 537,5 г Na_2SO_3 и 4462,5 г воды.

Приготовление растворов разбавлением и смешиванием по правилу «креста» (диагональной схемы). *Пример 1*: рассчитать, в каких соотношениях следует смешать 70%-ный и 10%-ный растворы серной кислоты для приготовления 50%-ного раствора.

Решение: по эмпирическому правилу «креста» искомую концентрацию (50 %) пишут в центре пересечения двух диагоналей, концентрации исходных растворов (70 и 10 %) — слева. Затем производят вычитание (из большего меньшее) по каждой диагонали ($70 - 50 = 20$ и $50 - 10 = 40$) и ответы записывают по концам диагонали справа:



Полученные цифры показывают, сколько частей по массе следует взять при смешивании исходных растворов (40 частей 70%-ного раствора и 20 частей 10%-ного раствора) для приготовления 50%-ного раствора. Суммарная масса раствора в данном случае составляет $40 + 20 = 60$ частей (граммов, килограммов, тонн и т. д.).

Если нужно приготовить определенную массу раствора, например 500 г, делают расчет по пропорциям:

60 г раствора (50%-ного) — 40 г (70%-ного)
500 г — x,

$$x = 500 \cdot 40/60 = 333 \text{ г};$$

60 г раствора (50%-ного) — 20 г (10%-ного)
500 г — x,

$$x = 500 \cdot 20/60 = 167 \text{ г}.$$

(Вторую пропорцию можно заменить вычитанием 500 − 333 = = 147 г.) Если известны плотности исходных растворов, рассчитывают их объем. Так, плотность 70%-ной H_2SO_4 равна 1,61 г/см^3, 10%-ной − 1,068 г/см^3:

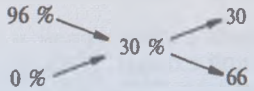
$$333/1{,}61 = 206{,}8 \text{ мл},$$

$$167/1{,}068 = 156{,}1 \text{ мл}.$$

Итак, в данном примере при смешивании 206,8 мл 70%-ного раствора и 156,1 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 получится 500 г 50%-ной серной кислоты. Воду можно рассматривать как раствор с нулевой концентрацией вещества и применять правило «креста» для расчетов по разбавлению раствора.

Пример 2: какие объемы 96%-ной серной кислоты (плотностью 1,84 г/см^3) и воды нужно взять для приготовления 100 мл 30%-ной H_2SO_4 (плотностью 1,22 г/см^3)?

Решение: составляем диагональную схему:



Следует смешать 30 г 96%-ного раствора H_2SO_4 и 66 г воды; получим 30 + 66 = 96 г заданного 30%-ного раствора H_2SO_4. Находим массу 100 мл заданного 30%-ного раствора: 100 · 1,2 = 122 г. Рассчитываем массы исходного раствора и воды для получения 122 г заданного раствора:

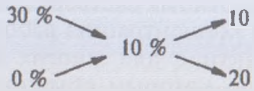
96 г — 30 г
122 г — x,
$x = 122 \cdot 30/96 = 32{,}12$ г;

96 г — 66 г
122 г — x,
$x = 122 \cdot 66/96 = 80{,}4$ г.

Находим объемы: 36,12/1,84 = 19,6 мл, плотность воды равна 1 г/см^3. Итак, нужно смешать 19,6 мл 96%-ного раствора H_2SO_4 и 80,4 мл воды для получения 100 мл 30%-ного раствора кислоты.

Пример 3: какой объем воды нужно прибавить к 200 мл 30%-ного раствора NaOH (плотностью 1,33 г/см^3) для получения 10%-ного раствора щелочи?

Решение: составляем диагональную схему:



При смешивании 10 г 30%-ного раствора NaOH и 20 г воды получится 10%-ный раствор. В нашей задаче дан определенный объем 30%-ного раствора — 200 мл. Находим массу 200 мл 30%-ного раствора, она равна $200 \cdot 1{,}33 = 266$ г. Рассчитываем, сколько граммов воды должно быть в заданном 10%-ном растворе на 266 г 30%-ного раствора, по пропорции:

10 г раствора (30 %-ного) — 20 г воды

266 г — x,

$$x = (266 \cdot 20)/10 = 532 \text{ г}.$$

Учитывая плотность воды (1 г/см^3), необходимо взять 532 мл воды.

Разбавление и смешивание растворов с применением формул. Разбавление растворов. Пусть a — масса раствора, m — его концентрация (%); раствор нужно разбавить до концентрации n (%) объемом воды V (мл), при этом масса разбавленного раствора составит $x = am/n$, а объем $V = a(m/n - 1)$.

Объем воды, равный V, приливают к массе первоначального раствора, равной a.

Смешивание растворов. Пусть имеется масса раствора a с концентрацией m (%) и раствор того же вещества с концентрацией l (%); необходимо получить раствор с концентрацией n (%). Масса второго раствора

$$x = l(n - m)/ln.$$

Эту массу смешивают с массой a первого раствора.

2.4. ТИТРОВАНИЕ РАСТВОРОВ

Для установления точной концентрации приготовленных рабочих растворов их титруют. Это одна из особо ответственных операций лабораторной техники. От правильности приготовления титрованных рабочих растворов зависят результаты анализа в целом. Для титрования необходимо иметь раствор исходного или стандартного вещества с точно известной концентрацией. При этом стандартные вещества должны быть химически чистыми, устойчивыми при хранении как в твердом состоянии, так и в растворе, строго соответствовать химической формуле. Например, щавелевая кислота может быть путем перекристаллизации получена химически чистой, строго отвечающей своей формуле $H_2C_2O_4 \times \times 2H_2O$. Концентрацию ее раствора вычисляют, зная навеску и

объем раствора. По стандартному раствору щавелевой кислоты титрованием устанавливают концентрацию рабочего раствора NaOH.

В аналитической практике для многих веществ установлены стандартные вещества, по которым обычно определяют их титр. Для подбора стандартных веществ пользуются руководствами по аналитической химии. Для определения концентрации рабочего раствора отбирают пипеткой отдельные порции раствора (аликвотную часть), титруют их, берут среднее значение из повторных титрований и рассчитывают концентрацию рабочего раствора по формуле $c(1/z)_1 V_1 = c(1/z)_2 V_2$, отсюда $c(1/z)_1 = (c(1/z)_2 V_2)/V_1$, где $c(1/z)_2$ и V_2 — нормальная концентрация и объем стандартного раствора; $c(1/z)_1$ и V_1 — концентрация и объем рабочего раствора, взятый на титрование (по пипетке или по бюретке в зависимости от того, что заливают в бюретку — рабочий или стандартный раствор). Раствор из бюретки приливают небольшими порциями при постоянном перемешивании содержимого колбы. Перед тем как дойти до точки эквивалентности, раствор из бюретки приливают по каплям. При повторном титровании скорость добавления раствора из бюретки не должна изменяться.

Сущность происходящих при титровании химических реакций, выбор индикатора, условия проведения реакции, порядок титрования описаны в соответствующих руководствах. Методы химического анализа в применении к биологическим объектам постоянно совершенствуются. Методики публикуются. В настоящее время в лабораториях широко используют автоматическое титрование.

В расчетах по результатам титрования в объемном анализе важно усвоить понятие *«титр раствора по определяемому веществу»*. Титр раствора, как уже говорилось, показывает содержание вещества (г) в 1 мл раствора и связан с нормальностью этого раствора соотношением

$$T = [c(1/z\,x)M(1/z\,x)]/1000.$$

Например, титр 0,1 н. раствора HCl

$$T_{HCl} = c_{HCl} M_{HCl}/1000 = (0{,}1 \cdot 36{,}5)/1000 = 0{,}00365$$

(г HCl в 1 мл раствора HCl).

Если рабочим раствором HCl необходимо проводить неоднократные определения какого-либо вещества, например NaOH, рассчитывают титр раствора HCl по определяемому веществу NaOH, с которым будет происходить реакция при титровании. В таком случае в формулу для расчета титра войдет эквивалентная масса того вещества (NaOH), с которым реагирует рабочий раствор (HCl). Ответ получают в граммах определяемого вещества NaOH, которые реагируют с 1 мл рабочего раствора:

$$T_{HCl/NaOH} = (c_{HCl} \cdot M_{NaOH})/1000$$

(г NaOH, вступивших в реакцию с 1 мл раствора HCl данной нормальной концентрации).

Титр раствора по определяемому веществу облегчает расчеты при анализе, так как достаточно умножить данный титр на объем рабочего раствора, пошедший на титрование, чтобы узнать массу нужного вещества, содержащегося в анализируемой порции. Например, если в приведенном случае при титровании какого-либо раствора NaOH израсходовано 15 мл 0,1 н. рабочего раствора HCl, то масса щелочи

$$Q(\text{NaOH}) = T_{\text{HCl/NaOH}} V_{\text{HCl}} = 0{,}00365 \cdot 15 = 0{,}05475 \text{ г}.$$

В таблице 2 приведены примеры приготовления индикаторов для кислотно-основного титрования.

2. Приготовление индикаторов

Индикатор	Область перехода (интервал pH)	Окраска		Способы приготовления
		кислотной формы	щелочной формы	
Метиловый оранжевый, 0,1%-ный раствор	3,1—4,4	Розовая	Оранжево-желтая	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл воды
Метиловый красный, 0,1%-ный раствор	4,4—6,2	Красная	Желтая	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Лакмус (азолитмин), 0,5%-ный раствор	5,0—8,0	»	Синяя	0,5 г индикатора растворяют в 100 мл воды
Фенолфталеин, 0,1%-ный раствор	8,0—10,0	Бесцветная	Красная	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Феноловый красный, 0,1%-ный раствор	6,8—8,0	Желтая	»	0,1 г индикатора растворяют в 100 мл 25%-ного водного раствора этилового спирта
Тимолфталеин, 0,5%-ный раствор	9,3—10,5	Бесцветная	Синяя	0,5 г индикатора растворяют в 100 мл этилового спирта
Универсальный индикатор (по Кольтгофу)*	2,0—10,0	—	—	Смешивают 0,1%-ные спиртовые растворы индикаторов: диметиламиноазобензол 15 мл, бромтимол синий 20 мл, метиловый красный 20 мл, фенолфталеин 20 мл, тимолфталеин 20 мл

* Универсальный индикатор имеет окраски: при pH 2 (и меньше) — красно-розовую, pH 3 — красно-оранжевую, pH 4 — оранжевую, pH 5 — желто-оранжевую, pH 6 — лимонно-желтую, pH 7 — желто-зеленую, pH 8 — зеленую, pH 9 — сине-зеленую, pH 10 (и выше) — фиолетовую.

2.5. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ СМЕСЕЙ, КОЛОНОК, СИЛИКАГЕЛЬНЫХ ПЛАСТИНОК

Растворы большинства чистых химических веществ имеют неустойчивый pH, который изменяется при добавлении кислот и щелочей. Многие биохимические анализы требуют выполнения реакций в условиях определенного интервала pH, мало изменяющегося при внесении небольших количеств кислоты или щелочи. Для этой цели применяют буферные растворы, представляющие собой смеси слабых кислот с солями этих кислот или смеси слабых оснований с солями слабых оснований. Буферным действием могут обладать смеси кислых солей разной основности, например $NaH_2PO_4 + Na_2HPO_4$, где первая соль играет роль слабой кислоты, а вторая — ее соли.

Способность раствора противостоять прибавлению кислоты или щелочи называется его буферной емкостью. Выражается она числом эквивалентных масс кислоты или щелочи, которые нужно прибавить к 1 мл раствора, чтобы его pH изменился на единицу. Для большинства буферных смесей интервал pH, в котором они обладают достаточным буферным действием, не превышает 2. Чтобы расширить этот интервал, пользуются буферными смесями, состоящими из нескольких слабых кислот и их солей, подобранных с таким расчетом, чтобы там, где кончается область буферного действия одной из них, начиналась область другой. Такие буферные смеси называются универсальными.

Буферные растворы готовят согласно разработанным рецептам. Исходные растворы для буферных смесей приготавливают особенно тщательно. Так, раствор NaOH не должен содержать соды. Для этого 100 г х. ч. NaOH растворяют в 120 мл воды и сливают в цилиндр, плотно закрытый пробкой. В таком концентрированном растворе сода не растворяется и выпадает в осадок. Затем раствор осторожно декантируют и разводят до требуемой концентрации.

Буферные растворы готовят на дистиллированной воде, из которой при кипячении (в течение 30—45 мин) удален CO_2, и хранят в сосудах с хлоркальциевой трубкой для предохранения от доступа CO_2 из воздуха.

Использование сефадекса в гель-фильтрации. В ветеринарных лабораториях широко используют методы хроматографии. Для разделения и фракционирования метаболитов получил распространение метод фильтрования растворов через гель, названный «сефадекс» (Швеция) — гель-фильтрация. Сефадекс имеет вид мелких зерен, набухающих в воде. Например, для разделения полисахаридов с различной молекулярной массой рекомендуют следующие типы сефадекса.

Тип сефадекса	*Молекулярная масса разделяемых полисахаридов*
G—25, мелкий	100—5000
G—50, грубый	500—10 000
G—75 »	1000—50 000
G—100 »	5000—100 000
G—200 »	5000—200 000

У белковых веществ диапазоны молекулярных масс шире, чем у полисахаридов.

Для использования сефадекса служит хроматографическая колонка из боросиликатного стекла с рубашкой. Вначале сефадекс смешивают с водой, полученную смесь взмучивают, вливают в колонку и дают осесть. Затем в колонку добавляют концентрированный раствор исследуемого вещества так, чтобы не взмучивался верхний слой сефадекса. Равновесие устанавливается быстро, скорость вымывания значительно выше по сравнению с обычными ионитами. Фракции контролируют спектрофотометрически или по электропроводности.

Приготовление силикагеля и пластинок для метода тонкослойной хроматографии (ТСХ). Метод ТСХ имеет ряд преимуществ перед другими методами хроматографического анализа (колоночной хроматографии и хроматографии на бумаге): вещества разделяются быстро — от нескольких минут до 2—3 ч; можно разделять малые количества вещества (0,1—0,05 мкг), а также выделять их препаративно (от 100 до 500 мг). Основан метод на сорбции растворенных веществ адсорбентом; при движении растворителя с разделяемой смесью веществ по неподвижной фазе — адсорбенту разделяемые компоненты перемещаются с различной скоростью в направлении движения растворителя. В качестве сорбентов применяют целлюлозу, Al_2O_3, кизельгур и др. Наибольшее применение получил силикагель — соединение общей формулы $SiO_2 \cdot nH_2O$.

Адсорбционные свойства силикагеля могут быть существенно изменены добавлением кислот, оснований, солей. Силикагель, пропитанный 100%-ным раствором сульфата аммония, используют для разделения липидов и фосфолипидов, обработанный фосфатным буфером — для разделения аминокислот. Силикагель, импрегнированный нитратом серебра, позволяет разделить отдельные молекулярные типы фосфолипидов в зависимости от степени ненасыщенности образующих их жирных кислот.

Для разделения липидов на отдельные фракции применяют марки силикагеля G, H, DC, L, КСК гранулированный и др.

Подготовка силикагеля марки КСК. При отсутствии специально предназначенных для тонкослойной хроматографии силикагелей рекомендуют продажный гранулированный или кусковой силикагель марки КСК или ШСК. Для этого кусковой силикагель измельчают на шаровой мельнице и пропускают с водой через сито. Через 30 мин воду удаляют декантацией, а осадок промывают сначала горячей водой, затем горячим этанолом, опять водой и концентрированной соляной кислотой до приобретения фильтратом светло-желтой окраски. Отмывают водой до отрицательной реакции на ионы хлора (помутнение 1—0,1%-ного раствора серебра нитрата). На ионы железа проверяют с роданидом аммонидом (калия, натрия). Отмытый силикагель сушат при 120—130 °С

в течение 5—6 ч и просеивают через сита с размером ячеек 150—200 мкм. Хранят в банках с притертыми пробками.

Приготовление ТСХ-пластинок с закрепленным слоем сорбента. При отсутствии в лаборатории специального аппликатора для нанесения слоя сорбента на хроматографические пластинки последние можно изготовить следующим образом. Просеянный через сито с отверстиями диаметром 150—200 мкм силикагель тщательно перемешивают с 6 % (по массе) чистого медицинского гипса или 1 % растворимого крахмала и наносят смесь на поверхность матированных с помощью наждачного порошка обезжиренных стеклянных фотопластинок (13 × 18 см). Толщина слоя сорбента, образуемого на пластинке, обеспечивается при разравнивании его стеклянной трубкой (диаметром 1,5—2 см), на которую на расстоянии 12 см друг от друга наматывают по нескольку витков проволоки диаметром 0,5 мм. Такие кольца служат ограничителями размера наносимого слоя, а также гарантируют его постоянную толщину (0,5 мм). Пластинки с нанесенным слоем сорбента размещают на строго горизонтальной поверхности и опрыскивают из пульверизатора дистиллированной водой до полного насыщения слоя. После подсушивания на воздухе (избегать пыли) пластинки помещают в сушильный шкаф и активируют при 105—110 °С в течение 1 ч или при 140 °С в течение 0,5 ч. Приготовленные таким образом пластинки хранят в эксикаторах над поглотителем (кальция хлорид). При длительном хранении пластинок их активность следует периодически проверять.

Если пластинки готовят для экспресс-метода, сорбент можно наносить на пластинку в виде жидкой взвеси силикагеля с гипсом или крахмалом в воде с помощью пипетки. Более или менее однородные по свойствам пластинки получают при нанесении одинаковых объемов такой взвеси на каждую пластинку. Отклонения от рекомендованных марок силикагелей и режимов их обработки допускаются в исключительных случаях.

2.6. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С РЕАКТИВАМИ, ПРАВИЛА ИХ ХРАНЕНИЯ

При работе в лаборатории особое внимание обращают на технику безопасности. При несоблюдении элементарных правил ее при проведении лабораторных работ, незнании свойств материалов, с которыми приходится иметь дело, неумелом обращении с реактивами и приборами могут происходить травмы. При работе необходимо придерживаться общих правил:

в лаборатории следует соблюдать чистоту и порядок; изучить по справочникам используемые в лаборатории вещества, обращая особое внимание на огнеопасность, ядовитость, возможность образования взрывчатых смесей с другими веществами;

анализы, связанные с применением концентрированных кислот и щелочей, а также с выделением вредных, ядовитых, огнеопасных

газов, паров, с образованием мелких кусочков веществ, разбрызгиванием жидкости, надо выполнять в вытяжном шкафу, а в некоторых случаях — в защитных очках, фартуках и нарукавниках;

работу с легковоспламеняющимися и взрывоопасными веществами (бензин, бензол, сероуглерод, ацетон, диэтиловый эфир и др.) проводить в вытяжном шкафу, вдали от огня и включенных нагревательных приборов (если нужно использовать водяную баню, то ее предварительно нагревают в другом месте, применяют также электроплитку со скрытыми нагревательными элементами); хранить их в толстостенных склянках, железных ящиках, выложенных асбестом; общий запас огнеопасных жидкостей в рабочем помещении лаборатории не должен превышать 2—3 л;

концентрированные и ядовитые жидкости не набирать в пипетку ртом, а пользоваться резиновой грушей или пипеткой с баллоном; при переливании их из больших бутылей в меньшие сосуды применять сифоны;

не бросать в раковину бумагу, твердые вещества, не выливать в нее остатки кислот, щелочей, огнеопасных и сильнопахнущих жидкостей; собирать их в специальные толстостенные, плотнозакрывающиеся склянки;

не нагревать закупоренные сосуды и аппараты, кроме специально для этого предназначенных;

соблюдать особую осторожность при работе со сжатыми газами (водородом, кислородом, хлором, метаном, ацетиленом, аммиаком и др.); предохранять баллоны от падения, ударов, толчков, нагревания; перекатывать баллоны осторожно, вручную, в наклонном положении;

при работе с вакуумом надевать защитные очки; при проведении работ в вакууме не применять плоскодонных колб — они будут раздавлены;

все химические реактивы хранить только в соответствующей посуде с этикетками и ясными надписями, а разлагающиеся на свету реактивы ($AgNO_3$ и др.) — в темной посуде;

соблюдать крайнюю осторожность при вскрытии склянок с реактивами, остерегаться повреждения склянок; если притертая стеклянная пробка сидит плотно, то горлышко сосуда обертывают смоченным горячей водой полотенцем и осторожно постукивают по верхней части пробки деревянным предметом, извлекая ее; можно склянку перевернуть вверх дном и опустить горлышком в сосуд с водой или разбавленной соляной кислотой; стеклянные краны, которые «заедает», открывают теми же приемами или отмачивают несколько часов в 5%-ном мыльном растворе.

Концентрированные растворы кислот и щелочей для постоянного пользования нужно держать в небольших бутылях и склянках вместимостью 1—2 л. Под такую посуду подкладывают кусок стекла или подставку из пластмассы, стойкой к кислотам и щелочам.

При разбавлении кислот, особенно серной и азотной, нужно добавлять кислоту к воде, иначе произойдет вскипание воды и разбрызгивание кислоты.

При переливании дымящих кислот, таких, как концентрированная соляная или дымящая азотная, надевают противогаз, респиратор или обвязывают рот и нос полотенцем, смоченным в растворе соды. Применение предохранительных очков при этом обязательно. Работу лучше проводить под тягой. Если кислота прольется на пол, ее тут же засыпают песком, собирают его и выносят из помещения. Облитое место обмывают раствором соды или аммиака.

Большие бутыли с кислотами и щелочами лучше хранить в стояках, тогда облегчается переливание из них и достигается бóльшая безопасность. Большие бутыли с кислотами, щелочами и другими агрессивными жидкостями хранят только в плетеных корзинах. Эти бутыли нельзя ставить прямо на пол, особенно каменный. На каждой бутыли должна быть этикетка: иногда к горлышку бутыли (или к корзине) прикрепляют фанерную дощечку с надписью о содержимом. Работу с большими бутылями (переноска, переливание и др.) нельзя выполнять одному.

Очень осторожного обращения требуют щелочи — гидроксиды натрия и калия, концентрированные растворы аммиака. Куски твердой щелочи нельзя брать руками, нужно надевать резиновые перчатки или пользоваться тигельными щипцами, которые после употребления тщательно обмывают. При разбавлении кусковой щелочи надевают резиновые перчатки и предохранительные очки. Взвешивают твердые щелочи в стеклянной или фарфоровой таре.

Растворение NaOH и KOH в воде вызывает сильное разогревание, поэтому щелочи растворяют не в стеклянной посуде, а в фарфоровых стаканах или чашках. Сначала готовят концентрированные растворы (32—40%-ные, плотностью 1,35—1,45 г/см^3), дают им отстояться (иногда несколько дней), затем раствор с осадка осторожно при помощи сифона переливают в другую посуду.

Хранят растворы щелочей и твердые щелочи в хорошо закрытой посуде, бутыли со щелочами нельзя закрывать стеклянными притертыми пробками. Концентрированные растворы щелочей сильно выщелачивают стекло бутылей, поэтому внутреннюю часть бутыли рекомендуют покрыть парафином или смесью церезина и вазелина, или сплавом парафина с полиэтиленом. Для этого несколько кусков парафина помещают внутрь бутыли и нагревают ее в сушильном шкафу или над электрической плитой (осторожно) до 60—80 °С. Когда парафин расплавится, бутыль поворачивают и распределяют разогретую массу тонким слоем по всей внутренней поверхности.

Работа с концентрированным раствором аммиака требует большого внимания и осторожности. Поступает он в лаборатории в виде 25%-ного водного раствора. Переливать его из крупных бутылей в мелкие нужно обязательно в противогазе, на открытом воздухе или под тягой.

2.7. ПОМОЩЬ ПРИ ОЖОГАХ И ОТРАВЛЕНИИ

При ожогах огнем делают длительную примочку раствором перманганата калия или этиловым спиртом, а затем обожженное место покрывают специальной эмульсией. При ожогах кислотами кожи или глаз обожженное место промывают большим количеством воды, а затем разбавленным раствором гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$). При ожогах едкими щелочами пораженное место хорошо обмывают проточной водой, затем 1%-ной уксусной кислотой; особенно опасны щелочи для роговицы глаза. При работе с твердыми щелочами обязательно надевают очки. Если на кожу попадет растворяющее органическое вещество, смывать водой его бесполезно, нужно быстро промыть большим количеством органического растворителя (спиртом, бензолом); причем избегают образования на коже концентрированных растворов.

В случае отравления хлором или парами брома следует длительно вдыхать спирт, затем выйти на свежий воздух.

При сильных ранениях, ожогах и отравлениях после оказания первой помощи пострадавшего немедленно направляют в поликлинику.

Медикаменты и перевязочные средства всегда должны находиться в лабораторной аптечке. Растворы гидрокарбоната натрия, аммиака и уксусной кислоты нужно держать на каждом рабочем столе.

Источники: 13, 15, 22, 23, 43, 46, 58, 61, 62.

ГЛАВА 3

ЛАБОРАТОРНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

3.1. ОТБОР И ПОДГОТОВКА ОБРАЗЦОВ КРОВИ К АНАЛИЗУ

Взятие образцов крови. Небольшое количество крови для общего анализа берут из сосудов внутренней или наружной поверхности ушной раковины. У собак, кошек, пушных зверей кровь берут из латеральной подкожной вены предплечья или голени, лапки (пальца), кончика хвоста; у кур — из гребня или сережки, вен внутренней поверхности крыла; у уток и гусей — из ступни конечности или большой плюсневой вены. Когда для анализа необходимо большое количество цельной крови, сыворотки или плазмы, кровь у крупного рогатого скота, лошадей, овец, коз, верблюдов берут из яремной вены, у свиней — из орбитального венозного синуса, у плотоядных — из вен конечностей, у птиц — из вен внутренней поверхности крыла.

У моногастричных животных кровь берут до кормления в утренние часы, у жвачных животных — утром через 4 ч после кормления. Время кормления существенно влияет на содержание в крови липидов, сахара, холестерина и некоторых других показателей. Чрезмерное возбуждение животного во время взятия крови (стресс) влияет на показатели кислотно-щелочного равновесия, сахара, многих гормонов, количество эозинофилов и лимфоцитов. Во многом биохимические показатели крови зависят от фармакологических препаратов, токсических веществ, испорченных кормов. Все эти факторы должны быть учтены при отборе проб крови.

Клинические лабораторные исследования. Исследуют цельную кровь, плазму и сыворотку. Проводят общий гематологический анализ цельной крови, а также определяют содержание в ней сахара, кетоновых тел, меди, цинка, кобальта, марганца, селена и др.

В плазме крови определяют резервную щелочность, содержание натрия, калия, хлора, кальция, магния, мочевины, билирубина, АсАТ и АсАТ, креатинкиназы, витаминов А, С, в сыворотке крови — общий белок и его фракции, мочевину, мочевую кислоту, креатин, свободные аминокислоты, липиды, холестерин, билирубин, кальций, фосфор, ферменты, белково-осадочные пробы и др.

В зависимости от характера исследований готовят одну или две пробирки. В пробирки для получения цельной крови или плазмы

предварительно вносят одно из противосвертывающих средств (антикоагулянт).

В качестве антикоагулянта используют гепарин (20 ИЕ/мл или 2—3 капли 1%-ного раствора на 10 мл крови); ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота): натрия (Na_2ЭДТА), калия (K_2ЭДТА, K_3ЭДТА) — 1,5 мг/мл или 3—4 капли 10%-ного раствора на 10 мл крови; цитрат натрия ($Na_3C_6H_5O_7$) — 1,5—2 мг/мл крови (используют только при исследовании СОЭ); оксалат натрия (Na_2CaO_2) — 3 мг на 1 мл крови (используют при подсчете количества клеток крови и исследовании их морфологии). Высыхание в пробирке дозированного раствора оксалата должно происходить при температуре не выше 80 °С. Передозировать антикоагулянты нельзя, так как высокая их концентрация вызывает в крови различные изменения, вплоть до гемолиза. Если кровь берут из сосудов сразу в меланжер (смеситель) или капилляр гемометра Сали, то антикоагулянт не используют.

В пробирки, предназначенные для получения плазмы крови, в которых предусмотрено определение резервной щелочности, кроме антикоагулянта добавляют по 0,5 мл вазелинового масла. Добавление гепарина не благоприятствует определению в крови электролитов, аммиака, натрия оксалата и цитрата — pH, кальция электролитов: ЭДТА-кальция и других, остаточного азота. Пробирки с раствором натрия цитрата или оксалата перед использованием высушивают при температуре не выше 80 °С.

Кровь в пробирки набирают по стенке во избежание гемолиза. В лабораторию ее доставляют в день взятия в термосе. При отправке в лабораторию не допускают замораживания или сильного охлаждения крови, так как это приводит к гемолизу.

В лаборатории кровь в пробирке для отделения сыворотки обводят тонкой спицей из нержавеющей стали и ставят в термостат при температуре 37—38 °С на 1 ч. Между взятием крови и получением сыворотки должно быть не более 5 ч. Отделившуюся сыворотку сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин, при 3000 мин$^{-1}$ (об/мин). Для получения плазмы кровь с антикоагулянтом центрифугируют в том же режиме. Плазма крови отличается от сыворотки содержанием фибриногена. Для лабораторных исследований пригодны сыворотка и плазма без гемолиза крови. Цельную кровь, плазму и сыворотку хранят в холодильнике в плотно закрытых пробирках.

Общий клинический анализ крови, определение в крови сахара проводят в день ее взятия, другие анализы обычно заканчивают в течение 1—3 дней. Для подсчета форменных элементов крови ее берут из капиллярных сосудов.

Кровь с антикоагулянтом хранят в закрытых пробирках в течение 24 ч при 2—8 °С, при комнатной температуре (15—20 °С) — 8 ч.

Основные требования к подбору материала, выбору антикоагулянта, условиям хранения образца крови и срокам анализа приведены в таблице 3.

3. Материал для исследования, антикоагулянт, условия хранения образца, сроки анализа

Исследуемый показатель (вещество)	Материал для исследования, антикоагулянт	Срок хранения
Гематокрит	ЦК, ЭДТА натрия	48 ч при 4 °С, 6 ч при 23 °С
Гемоглобин	ЦК, ЭДТА натрия, возможны гепарин, оксалат	48 ч при 4 °С, 24 ч при 23 °С
Глюкоза	ЦК, ПК, натрия фторид. Осаждение белков в момент взятия крови	Центрифугат 8 ч при комнатной температуре, до 3 сут в бытовом холодильнике
Кетоновые тела	ЦК, гепарин. Приготовление безбелкового фильтрата в день взятия крови	Безбелковый фильтрат до 3 сут в холодильнике
Резервная щелочность	ПК, гепарин, ЭДТА и др.	До 1 сут в холодильнике
Минеральные вещества:		
фосфор неорганический	СК, ПК, гепарин и др. Быстро отделить плазму, не допускать гемолиз	До 2 сут в холодильнике. При хранении содержание фосфора возрастает
магний	ПК, гепарин и др.; СК. Не допускать гемолиз	До 5 сут в холодильнике
кальций	СК, ПК свободная от гемолиза	До 3 сут в холодильнике
железо	То же	2—3 сут в холодильнике
Белок общий	СК, свободная от гемолиза; ПК, гепарин и др.	До 3 сут в холодильнике
Белковые фракции	СК, свободная от гемолиза	До 3 сут в холодильнике
Билирубин	СК, свободная от гемолиза, ПК, гепарин	Исследуют в течение 2 ч. Защищают от солнечного света
Холестерол (холестерин общий)	ПК, ЭДТА, гепарин, но не оксалат, цитрат, СК или ПК, свободные от гемолиза	До 5 сут в холодильнике
Витамины:		
ретинол, каротин	СК, свободная от гемолиза	2 нед в замороженном состоянии. Защищают от солнечного света
С	ПК, гепарин и др.; СК без следов гемолиза	3 ч проба стабильна в охлажденной крови. Плазму и сыворотку стабилизируют метафосфорной кислотой (6 г/100 мл), ТХУ, или трихлоруксусной (10 г/100 мл) кислотой. Хранят при 20 °С 21 сут

Продолжение

Исследуемый показатель (вещество)	Материал для исследования, антикоагулянт	Срок хранения
Е	СК, свободная от гемолиза	Несколько дней в холодильнике. Защищают от солнечного света
Ферменты:		
лактатдегидрогеназа	СК или ПК, свободные от гемолиза, гепарин	Не охлаждают, исследуют в день взятия крови
аспартатаминотрансфераза	То же	Не охлаждают, исследуют в день взятия крови
аланинаминотрансфераза	»	Не замораживают, исследуют в день взятия крови
холинэстераза	СК или ПК, свободные от гемолиза, гепарин, ЭДТА натрия; цитратную или оксалатную плазму крови исследовать нельзя	6 ч при комнатной температуре, 1 нед при 4 °С, 6 мес при минус 70 °С
щелочная фосфотаза	Свежая сыворотка крови, свободная от гемолиза	СК охлаждают немедленно, исследуют быстро. При хранении активность фермента возрастает

Обозначения: ЦК — цельная кровь; ПК — плазма крови; СК — сыворотка крови.

Наборы реактивов. При лабораторных исследованиях используют как отдельные реактивы (ч. д. а., х. ч.), так и их наборы. Для лабораторных анализов выпускают наборы реактивов заводского изготовления, снабженные инструкцией. При использовании их повышается гарантия качества выполняемых лабораторных исследований. При определении содержания гормонов, опухолевых маркеров, использовании автоанализаторов применяют только наборы реактивов заводского изготовления. К ним предъявляют определенные требования, в частности, срок хранения набора при определенных условиях (например, в холодильнике) должен быть не менее 6 мес со дня выпуска. Стабильность рабочих растворов, если возможно, должна сохраняться 1 нед, но не менее чем в течение рабочего дня. Качество реактивов должно быть гарантировано.

Большинство наборов реактивов предназначены для определения одного показателя, но имеются и такие, с помощью которых

в биологической жидкости можно устанавливать 2 вещества и более (например, холестерин и мочевую кислоту).

В лабораторной практике широко применяют другие готовые аналитические формы — диагностические полоски, изготовленные на принципах «сухой химии». Они предназначены для качественного, полуколичественного и количественного определения биохимических компонентов в биологических жидкостях. В диагностических полосках все реагенты в твердой фазе нанесены на подложку в необходимом количестве. Нанесенные на подложку химические реагенты вступают в реакцию с исследуемым веществом в растворителе, которым является биологическая жидкость. Фирмы «Лахема» (Чехия»), «Рош Диагностикс», «Мерк» (Германия), «Ames» (США) и др. выпускают экспресс-тесты в виде моно- и политестов для исследования в моче pH, кетонов, глюкозы, белка, билирубина, уробилиногена, эритроцитов, гемоглобина, нитратов, удельного веса; в крови — мочевины, глюкозы, псевдохолинэстеразы. Для количественного определения биохимических показателей с использованием системы «сухой химии» разработаны измерительные приборы — специальные фотометры, флюоресцентные спектроскопы и др. Так, фирма «Эймс» (США) выпускает комплект «Серолайзер», позволяющий определять в крови (сыворотке) гемоглобин и некоторые другие показатели. Фирмой «Рош Диагностикс» (Швейцария) разработаны отражательные фотометры и диагностические полоски для определения различных показателей крови. Например, система «Рефлотест» позволяет определять в субстратах количество глюкозы, мочевины, билирубина и его фракций, креатинина, белка, триглицеридов, холестерина, альбумина, активность АлАТ, АсАТ, ЛДГ, КК, гамма-ГТ, липазы, щелочной фосфатазы, ионов (фосфора, кальция, аммиака), а также некоторых лекарств (фенобарбитала, теофиллина и др.).

В качестве диагностических полосок применяют многослойные пленки, в которых в качестве подложки используют негнущийся пластик или другой подобный материал. Многослойные пленки, объединенные в слайд, были впервые разработаны фирмой «Кодак» (США). Система «Кодак Эктахем» объединяет слайды и прибор, позволяющие определять в сыворотке крови более 20 биохимических компонентов. Фирма «Optho-Clinical Diagnosties France» (США) выпускает систему «VITROS» для экспресс-диагностики электролитов, ферментов, липидов и иммунодиагностических исследований в моче и сыворотке крови.

Для количественного определения веществ с низкой молекулярной массой (дигостин, фенитоин, фенобарбитал) используют иммуноферментный тест на основе конкуренции.

Недостатками систем «сухой химии» являются высокая стоимость анализа, зависимость выбора метода от производителя, возможность интерференции лекарств.

Источник: 27.

3.2. МЕТОДЫ ОБЩЕГО КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ

К методам общего клинического гематологического анализа относят подсчет количества эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, дифференциальный подсчет лейкоцитов, определение гематокрита, гемоглобина, осмотической резистентности эритроцитов, времени свертывания крови, времени рекальцинации плазмы, скорости оседания эритроцитов (СОЭ), длительности кровотечения и некоторые другие. Анализы выполняют известными (рутинными) методами или используют автоанализаторы.

Подсчет эритроцитов в камере Горяева. Принцип. Точное количество крови равномерно смешивают в определенном количестве жидкости и помещают в камеру с известным объемом, в котором взвесь крови распределяется одним слоем. Дно камеры разграфлено, благодаря чему возможен точный подсчет эритроцитов.

Реактивы: 0,9%-ный раствор натрия хлорида.

Специальное оборудование: микроскоп, камера Горяева, пробирки лабораторные или капилляр от гемометра Сали.

Ход определения. В сухую чистую пробирку вносят 8 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и капиллярной пипеткой 0,02 мл крови. Предварительно кончик пипетки вытирают, кровь выдувают на дно пробирки, а пипетку тщательно промывают верхним слоем жидкости. Содержимое пробирки хорошо перемешивают. Получают разведение крови 1 : 400, т. е. кровь разбавляют в 400 раз. При сгущении крови ее целесообразно разбавить в 500, 600, 700, 800 раз.

Камера и покровное стекло должно быть вымыты и насухо вытерты. Покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Берут каплю разведенной крови из пробирки и заполняют ею камеру, нанося к краю покровного стекла. Эритроциты подсчитывают через 1 мин после заполнения камеры под малым увеличением микроскопа (объектив ×8, окуляр ×10 или ×15) с прикрытой диафрагмой или опущенным конденсатором (в затемненном поле зрения). Эритроциты подсчитывают в пяти больших (или 80 малых) квадратах, расположенных по диагонали. Учитывают эритроциты, лежащие внутри малого квадрата, а также на левой и верхней его стенках. Клетки, находящиеся на правой и нижней линиях квадрата, не считают.

Расчет. Подсчитанное число клеток в 80 малых квадратах умножают на 20 000 при разведении крови 1 : 400, на 25 000 при разведении 1 : 500 или на 30 000 при разведении 1 : 600 и получают окончательный результат в миллионах в 1 мкл. При этом исходят из того, что объем одного малого квадрата равен 1/4000 мкл. Для подсчета клеток в 1 л количество эритроцитов в 1 мкл еще умножают на 1 000 000 (10^{12}/л).

Примечание. Не допускается исследование крови со сгустками; подсчет клеток тотчас после заполнения камеры (не выжидая 1 мин); использование плохо вымытых и просушенных пипеток и пробирок, недоброкачественных реактивов, вызывающих гемолиз. При соблюдении всех правил подсчета ошибка составит в среднем ±2,5 %.

Подсчет лейкоцитов в камере Горяева. Принцип. Количество лейкоцитов подсчитывают в определенном объеме камеры с известным разведением крови.

Реактивы: 3%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым синим или генцианом фиолетовым из расчета 1 мл 1%-ного водного раствора красителя на 100 мл уксусной кислоты.

Оборудование: микроскоп, камера Горяева, пробирки, микропипетки или капилляр от гемометра Сали.

Ход определения. От каждого животного целесообразно готовить 2—3 образца разведенной крови. В пробирку вносят 0,4 мл 3 или 5 %-ного раствора уксусной кислоты, подкрашенного метиленовым синим (жидкость Тюрка). Капиллярной пипеткой набирают 0,02 мл крови, конец пипетки тщательно протирают вначале увлажненной, а затем сухой ватой или марлей. Переносят кровь в пробирку, осторожно выдувая. Пипетку ополаскивают жидкостью Тюрка. Кровь в пробирке тщательно перемешивают, закрывают и оставляют стоять на 4 мин, периодически перемешивая содержимое.

Счетную камеру предварительно тщательно обезжиривают спиртом, промывают дистиллированной водой и высушивают под феном, протирают мягкой фланелью. Чистое сухое покровное стекло притирают к камере так, чтобы появились радужные кольца. Кровь в пробирке снова перемешивают стеклянной палочкой, берут каплю крови и наносят к краю покровного стекла камеры. Подсчитывают лейкоциты через 1 мин после заполнения камеры, когда осядут клетки крови, пользуясь малым увеличением микроскопа (объектив ×8, окуляр ×10) при затемненном поле, для чего опускают конденсор или суживают диафрагму.

Подсчитывают лейкоциты в 100 больших (1600 малых) квадратах.

Расчет. Подсчитанное в 100 больших квадратах число клеток умножают на 50 (разведение крови 1 : 20), получают окончательный результат в тысячах в 1 мкл. Для подсчета клеток в 1 л количество лейкоцитов в 1 мкл умножают на 1000 (10^9/л).

При подсчете лейкоцитов в камере соблюдают все те же правила, которые изложены в методике подсчета эритроцитов. Ошибка при подсчете составляет в среднем ±7 %.

Наиболее вероятные источники ошибок — травмирование тканей ушной раковины при выжимании, выдавливании крови; неравномерное перемешивание крови; не очень чистый микрокапил-

дяр и др. Каждый лабораторный работник должен выявить собственную ошибку путем многократных анализов одной и той же пробы, включая взятие крови.

Клиническое значение определения в крови эритроцитов и лейкоцитов. Родоначальной клеткой для всех форменных элементов крови является стволовая клетка, которая дает начало общей клетке — предшественника миелопоэза и общей клетке — предшественника лимфопоэза. Из клетки — предшественника миелопоэза в миелоидной системе (костный мозг), проходя определенные стадии дифференцировки, образуются эритроциты, тромбоциты, моноциты и зернистые лейкоциты. Из клетки — предшественника лимфопоэза в лимфоидной системе образуются лимфоциты: Т-лимфоциты — клетки, обеспечивающие реакции клеточного иммунитета и В-лимфоциты — клетки, обеспечивающие реакции гуморального иммунитета.

Кровь здоровых животных содержит зрелые клетки: эритроциты, тромбоциты, лейкоциты (базофилы, эозинофилы, палочкоядерные и сегментоядерные нейтрофилы, лимфоциты, моноциты) и тучные клетки (цвет. рис. I—VII). Появление незрелых промежуточных клеток миелопоэза (ретикулоцитов, нормоцитов, эритробластов, миелобластов, миелоцитов и др.) и лимфопоэза (плазмобластов, пролимфоцитов, лимфобластов и др.) свидетельствует о развитии патологии кроветворения.

Эритроциты — мелкие клетки крови, содержащие гемоглобин, благодаря чему способны переносить кислород от легких к тканям и углекислый газ от тканей к легким. Зрелые эритроциты млекопитающих — безъядерные клетки, имеют форму двояковогнутого диска. Эритроциты птиц и низших позвоночных — ядерные клетки эллипсовидной формы.

В нефиксированном (нативном) препарате эритроциты выглядят как желтоватые округлые образования. В фиксированных и окрашенных мазках крови они обнаруживаются как круглые клетки розового или серовато-розового цвета с просветлением в центре.

Тромбоциты — кровяные пластинки. Это мелкие, безъядерные клетки крови диаметром 5 мкм в количестве от 200 до 900 тыс/мкл, участвуют в свертывании крови. В окрашенных мазках крови они выглядят как мелкие круглые или овальные образования. При снижении их числа наблюдается кровоточивость, развивается гемофилия.

Лейкоциты — разнообразные по морфологическим признакам и функциям клетки сосудистой системы крови. Они выполняют функции защиты организма путем фагоцитарной активности и участия в формировании гуморального иммунитета, в восстановительном процессе при тканевом повреждении. Лейкоциты, в цитоплазме которых содержится специфическая зернистость, называются зернистыми, или гранулоцитами. К ним относятся нейтрофилы (палочкоядерные, сегментоядерные и юные), эозинофилы и базофилы. Незернистые лейкоциты (агранулоциты) характеризу-

ются отсутствием специфической зернистости в цитоплазме и несегментированными ядрами. В группе агранулоцитов выделяют два вида — лимфоциты и моноциты.

Содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов у взрослых животных в норме приведено в таблице 4.

4. Содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов у животных

Вид животного	Эритроциты, млн/мкл (10^{12}/л)	Лейкоциты, тыс/мкл (10^9/л)	Тромбоциты, тыс/мкл (10^9/л)
Крупный рогатый скот	5,0—7,5	4,5—12,0	260—700
Лошадь	6,0—9,0	7,0—12,0	200—500
Овца	7,0—12,0	6,0—14,0	270—500
Свинья	6,0—7,5	8,0—16,0	180—300
Коза	12,0—17,0	6,0—12,0	300—900
Буйвол	5,2—8,7	5,5—12,1	220—380
Верблюд	10,6—16,6	11,5—20,5	200—400
Северный олень	9,0—14,0	6,0—10,0	200—500
Осел	5,0—7,0	7,0—9,0	200—500
Мул	5,1—6,8	7,0—8,0	200—400
Собака	5,2—7,4	6,0—12,0	250—550
Кошка	6,6—9,4	10,5—15,0	100—500
Птица (курица, утка, гусь)	2,5—4,5	20,0—40,0	—
Морская свинка	4,6—6,7	7,8—15,5	—
Норка	8,1—9,3	4,3—7,1	—
Лисица	8,3—10,3	4,2—7,0	—
Песец	7,6—9,0	4,7—6,9	—
Кролик	5,0—7,5	6,5—9,5	—

Уменьшение количества эритроцитов — эритроцитопения (олигоцитемия) встречается при длительном недокорме животных, постгеморрагической, гемолитической, железодефицитной, гипопластической анемиях, B_{12} (фолиево)-дефицитной анемии, лейкозах, злокачественных новообразованиях. Олигоцитемия развивается при инфекционной анемии лошадей, гематурии крупного рогатого скота, пироплазмозе, нутталиозе, трипанозомозе, многих острых и хронических инфекционных и инвазионных болезнях, гепатите и гепатозе, хроническом нефрите.

Увеличение количества эритроцитов (полицитемия, эритроцитоз) встречается при сильной диарее вследствие сгущения крови, при обильном потоотделении, непроходимости тонкого кишечника, сильной мышечной нагрузке.

Нахождение животных на высоте 1400—2000 м и выше над уровнем моря сопровождается повышением содержания эритроцитов в крови.

Увеличение количества лейкоцитов (лейкоцитоз) бывает патологическое и физиологическое. Патологический лейкоцитоз отмечается при гнойно-воспалительных процессах, сопровождающих пневмонию, бронхопневмонию, плеврит, перикардит, ретикулоперитонит, перитонит, абсцессы печени, эндометрит и многие другие болезни. Выраженный лейкоцитоз наблюдается при ряде инфекционных болезней, хирургической инфекции, лейкозах, лимфогранулематозе. Лейкоцитоз возникает при отравлениях мышьяком, ртутью, укусах ядовитых насекомых, змей. Увеличение количества лейкоцитов может быть в результате введения больших доз камфоры, калия йодида, белковых препаратов, вакцин, сывороток.

Физиологический умеренный лейкоцитоз бывает при беременности, после физических нагрузок, приема богатой белком пищи (у плотоядных), стрессах.

Уменьшение количества лейкоцитов (лейкоцитопения, лейкопения) может быть результатом угнетения кроветворных органов, истощения их, пониженной реактивности организма; лейкопению отмечают при вирусных болезнях, циррозе печени, поражении селезенки, действии ионизирующей радиации, ряда химических веществ и лекарственных препаратов. Смена лейкоцитоза лейкопенией при воспалительных и гнойно-септических заболеваниях служит показателем понижения резистентности организма, угнетения кроветворения, ухудшения состояния больного животного.

Течение заболеваний, для которых характерна лейкоцитопения, наблюдается у ослабленных, истощенных животных. Лейкоцитопения может быть следствием длительного введения в организм больших доз сульфаниламидов, амидопирина, левомицетина, синтомицина, препаратов ртути, мышьяка, висмута. Она отмечается при алейкемической форме лейкоза, отравлениях ДДТ и некоторыми другими ядами.

Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкограмма). Проводят визуальную микроскопическую оценку сухих фиксированных окрашенных мазков крови с дифференцированным подсчетом лейкоцитов и описанием морфологии эритроцитов.

Лейкограмма выражается как процентное соотношение между отдельными видами лейкоцитов крови.

Морфологическое исследование мазков крови включает следующие этапы: подготовку стекол, приготовление, фиксацию, микроскопическую и морфологическую оценку мазков.

Подготовка предметных стекол. Предметные стекла должны быть чистыми, обезжиренными и сухими. Бывшие в употреблении или новые стекла замачивают в эмалированной посуде в стиральном порошке. Старый мазок удаляют ватным тампоном и стекла кипятят в том же растворе 10—15 мин, затем их промывают в проточной воде, насухо протирают и помещают на 30—60 мин в смесь Никифорова (этиловый спирт 96°%-ный и диэтиловый эфир

в соотношении 1 : 1), после чего протирают насухо чистой тканью и помещают на хранение в посуду с крышкой.

Примечания. 1. Длительное кипячение (более 10 мин) предметных стекол и кипячение их в алюминиевой посуде приводит к помутнению стекол. 2. Полноту отмывки от щелочных средств проверяют качественной реакцией с 0,1%-ным спиртовым раствором фенолфталеина, путем нанесения 2—3 капель на чистое стекло. Появление розового окрашивания свидетельствует о плохой промывке стекол.

Приготовление мазков. Мазки крови готовят на предварительно подготовленных обезжиренных предметных стеклах. Берут за ребра (а не за поверхность) предметное стекло и, отступая 1,5—2 см от узкого конца, наносят на него небольшую каплю крови. Шлифовальным стеклом, которое несколько уже, чем предметное, на которое нанесена капля крови, размазывают последнюю. Для этого шлифовальное стекло узким краем ставят под углом 45° слева от капли, слегка подвигают его вправо, чтобы провести с ней соприкосновение, выжидают, пока капля расплывется по всему ребру, и легким быстрым движением ведут стекло справа налево, пока капля будет исчерпана.

При медленном размазывании ухудшается равномерность распределения форменных элементов в мазке. При нажимании стеклом на стекло многие клетки повреждаются. Если угол между стеклами меньше 45°, то большее количество клеток скапливается в конце мазка. Величина капли должна быть соразмерна тому, чтобы весь мазок помещался на стекле, не доходя 1—1,5 см до его конца. Мазок должен иметь желтоватый цвет. Густо-розоватые и красноватые мазки не пригодны для счета, так как лейкоциты в них деформированы, а эритроциты лежат один на другом. Если была взята слишком большая капля, то после того как она распределилась по ребру шлифованного стекла, последнее приподнимают, переносят на несколько миллиметров влево, вновь ставят на предметное стекло и отсюда начинают делать мазок. Мазок тотчас сушат на воздухе. На сухом мазке по его середине иглой пишут номер или кличку животного, при необходимости и дату взятия крови.

Фиксация мазков. Фиксирующая жидкость вызывает коагуляцию белка и прикрепляет клетку к стеклу. Фиксация придает форменным элементам крови стойкость по отношению к содержащейся в краске воде и препятствует деформации эритроцитов и лейкоцитов.

Реактивы: метиловый спирт (х. ч.) или эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду (раствор), или этиловый спирт 96%-ный.

Оборудование: штатив для сушки мазков; пинцет; широкогорлая банка с притертой пробкой или крышкой.

Ход определения. Высохшие на воздухе мазки опускают в широкогорлую банку с крышкой, выдерживают в фиксаторе

5—10 мин, затем извлекают пинцетом и высушивают на воздухе. В этиловом спирте мазки выдерживают не менее 35 мин.

Для фиксации и последующей обработки необходимо отбирать правильно приготовленные тонкие мазки (мазок должен быть желтого цвета, отступать от края широких сторон предметного стекла на 1—3 мм и заканчиваться «метелочкой», не доходя 1,5—2 см до левого узкого края).

Окраска мазков. *Оборудование*: контейнеры для окраски мазков с кюветами или «рельсы» стеклянные с эмалированными держателями; пинцет; цилиндры или стаканы градуированные; палочки стеклянные; стаканчики химические; бутылки с притертыми пробками.

В строго нейтральной среде структурные элементы клеток крови в азур-эозиновой смеси окрашиваются в различные цвета: щелочные компоненты клетки (цитоплазма) — эозином в розово-красный цвет; кислые (РНК в ядрышках и цитоплазме, ДНК в ядре) — основными красителями в голубовато-синие цвета. Для приготовления красителей и смывания их с мазков используют воду нейтральной реакции. Вода кислой реакции ослабляет действие щелочного элемента красителя (азура II), вследствие чего лейкоциты плохо окрашиваются. Мазки имеют красный цвет за счет красной окраски эритроцитов и ядер лейкоцитов. Вода щелочной реакции ослабляет действие кислого компонента красителя (эозина), поэтому эритроциты окрашиваются в серовато-синий цвет, а ядра лейкоцитов — в очень темные цвета. Для подщелачивания и доведения реакции воды до нейтральной к ней по каплям прибавляют 1%-ный раствор натрия двууглекислого. Щелочную воду нейтрализуют 1%-ным раствором уксусной кислоты. Можно брать дистиллированную и водопроводную воду в различных сочетаниях.

Реакцию воды можно определить с помощью pH-метра или гематоксилина. При использовании гематоксилина к 10 мл дистиллированной воды прибавляют 2—3 капли свежеприготовленного спиртового раствора гематоксилина. Вода нейтральной реакции окрашивается в бледно-фиолетовый цвет не ранее чем через 1 мин и не позднее чем через 5 мин. Если вода окрасилась раньше чем через 1 мин, значит, она щелочная, а если позднее чем через 5 мин, — кислая.

Окраска по Нохту. Реактивы:

1) основные растворы красителей — азур II, 1 г/л (1,0 г азура II растворяют в 1000 мл дистиллированной воды) и эозин калия, 1 г/л (1,0 г эозина калия растворяют в 1000 мл дистиллированной воды). Растворы готовы к употреблению через 14 дней со дня приготовления, хранят их в посуде темного стекла с притертой пробкой при комнатной температуре;

2) фосфатный буфер или смесь Вейзе (pH 7,4—7,5): калия фосфат однозамещенный безводный (KH_2PO_4) 0,49 г, натрия фосфат

двузамещенный ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) 1,14 г или безводный (Na_2HPO_4) 0,909 г, дистиллированная вода 1000 мл.

Рабочий раствор готовят перед употреблением, смешивая 25 мл основного раствора азура II, 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл буферного раствора. Пропорции красителей могут несколько варьировать и должны быть установлены опытным путем при приготовлении свежей порции основных растворов красителей.

Фиксированные сухие мазки помещают в контейнер, который опускают в кювету с рабочим раствором красителя и выдерживают в нем строго определенное время, подобранное для каждой партии краски, — от 20 до 45 мин. Затем контейнер переносят в кювету с водопроводной водой. После этого мазки ставят вертикально в штатив для сушки.

При отсутствии штатива-контейнера высушенные мазки можно красить на «рельсах», заливая мазок рабочим раствором красителя возможно более высоким слоем (2—3 мл на мазок).

Окраска по Паппенгейму. Реактивы: 1) эозин метиленовый синий по Май-Грюнвальду (раствор). При отсутствии заводского раствора готовят 5 г/л раствора сухого красителя в метиловом спирте (х. ч.). Раствор готов к употреблению через 4 дня; 2) рабочий раствор азур-эозина по Нохту.

Сухие нефиксированные мазки помещают в контейнер и опускают в кювету с раствором красителя-фиксатора Май-Грюнвальда на 5 мин. Затем контейнер с мазками ополаскивают в кювете с дистиллированной водой и помещают к кювету с рабочим раствором азур-эозина по Нохту на 8—15 мин. Смывают краску, переносят контейнер в кювету с дистиллированной водой. Мазки высушивают на воздухе.

Окраска по Романовскому—Гимзе. Реактивы: 1) готовый заводской краситель Романовского—Гимзы (азур-эозиновая смесь); 2) рабочий раствор — 2 капли красителя на 1 мл дистиллированной воды. Готовят его перед употреблением.

Фиксированные мазки в кювете заливают рабочим раствором красителя Романовского—Гимзы и выдерживают 15—30 мин. Затем мазки промывают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Продолжительность окраски зависит от качества красителя и температуры воздуха. Чем ниже температура воздуха, тем продолжительнее окраска. Выбор оптимального времени окраски проводят всякий раз, когда начинают использовать новый флакон заводского красителя. Хорошо окрашенные мазки имеют розово-фиолетовый цвет, недоокрашенные — розовато-красноватый, перекрашенные — темно-фиолетовый.

Микроскопическое исследование мазков крови. Реактивы: иммерсионное масло; диэтиловый эфир или этиловый спирт.

Оборудование: микроскоп; осветитель для микроскопа; 11-клавишный счетчик для выведения лейкоцитарной формулы; капельница.

Просматривают мазок крови под малым увеличением микроскопа (объектив ×10, окуляр ×7). Подсчет лейкоцитов и оценка морфологии эритроцитов допустимы только в тонкой части мазка, где эритроциты лежат одиночно, а не сложены в «монетные столбики».

На край мазка помещают каплю иммерсионного масла, переводит на иммерсионный объектив (×90). Лейкоциты подсчитывают по зигзагу (по линии «Меандра»), отступя 2—3 поля зрения от верхнего края мазка, в начале в 3—5 полях зрения вдоль края мазка, затем в 3—5 полях зрения под прямым углом к середине мазка, потом в 3—5 полях зрения параллельно краю мазка и вновь под углом 90° возвращаются к краю мазка. Такое движение продолжают до тех пор, пока не будет сосчитана половина клеток, необходимая для выведения лейкограммы. Затем переходят на противоположную сторону мазка и подсчитывают вторую половину клеток. Подсчитывают только целые (неразрушенные) клетки.

В норме в крови выявляются лейкоциты следующих форм: базофилы, эозинофилы, нейтрофилы палочкоядерные и сегментоядерные, лимфоциты, моноциты. При наличии в мазках крови плазматических клеток, незрелых, бластных и труднодифференцируемых форм лейкоцитов их также вводят в лейкограмму, описывают их морфологию.

Одновременно с выведением лейкограммы оценивают морфологию лейкоцитов. Если в анализе крови не было выявлено отклонений от нормы количественного состава форменных элементов крови, а при подсчете 100 лейкоцитов не обнаружено никаких отклонений от нормы ни в лейкограмме, ни в морфологии лейкоцитов, то можно ограничиться подсчетом 100 клеток. Если при этом были выявлены какие-либо отклонения от нормы, то необходимо подсчитывать не менее 200 лейкоцитов.

Лейкограмма дает представление только об относительных величинах. Более объективное представление о составе лейкоцитов крови дает вычисление их абсолютного количества, т. е. содержание каждого вида лейкоцитов в определенном объеме крови.

Для подсчета эритроцитов и лейкоцитов крови, их дифференцировки можно пользоваться поточными автоматическими гематологическими цитометрами. Эти приборы позволяют определять гематокрит; количество эритроцитов; рассчитать среднее содержание гемоглобина в эритроците, т. е. отношение концентрации гемоглобина (г/л) к числу эритроцитов крови (МСН); среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците, т. е. отношение концентрации гемоглобина (г/л) к величине гематокрита (л/л) (МСНС); выделить различные группы клеточных элементов, отличающихся не только по размеру, но и по зернистости. Анализаторы типа STKS позволяют подсчитать общее количество лейкоцитов и построить их гистограмму, выделить лимфоциты, моноциты, эозинофилы, гранулоциты, а также нетипичные клетки (ядерные эритроциты, сгустки тромбоцитов, лимфобластов, гранулоцитов).

Различные фирмы выпускают автоматические гематологические анализаторы: H6000, H1 и H2 (фирма «Technicon»), STKS («Coulter»), NE 8000 («TOA»), «Sysmex», Cell-Dyn 3000 («Abbott»), Codas Argoss 5Diff («Roche») и др.

Подсчет количества лейкоцитов требует применения в качестве антикоагулянта этилендиаминтетрауксусной кислоты (трилона В), так как гепарин может интерферировать с лизирующими клетками реагента.

Клиническое значение показателей лейкограммы. Процесс образования, развития и созревания клеток крови (гемопоэз — кроветворение) у человека и животных происходит в костном мозге, селезенке и в лимфатических узлах. В костном мозге образуются эритроциты, тромбоциты, моноциты и зернистые лейкоциты (базофилы, сегментоядерные нейтрофилы); в лимфатических узлах и селезенке — лимфоциты.

При анализе лейкограммы учитывают количество зрелых клеток: базофилов, эозинофилов, палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов, лимфоцитов и моноцитов. При ряде патологических состояний дают оценку незрелых, молодых форм эритроцитов и лейкоцитов (лимфобластов, промегакариоцитов, мегакариоцитов, нормобластов, промиелоцитов, миелоцитов, мета-миелоцитов, пролимфоцитов).

Форменные элементы крови здоровых животных различных видов приведены на цветных рисунках I—IV. Нормальные величины количества различных видов лейкоцитов крови у взрослых здоровых животных представлены в таблице 5.

При оценке результатов исследования лейкоцитов учитывают общее их количество, наличие ядерного сдвига нейтрофилов, процентное соотношение лейкоцитов отдельных видов, наличие или отсутствие дегенеративных изменений в клетках.

5. Содержание лейкоцитов в крови здоровых животных различных видов (лейкограмма), %

Вид животного	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		Лимфоциты	Моноциты
			палочкоядерные	сегментоядерные		
Крупный рогатый скот	0,0—2,0	3—8	2—5	20—35	40—75	2—7
Лошадь	0,0—1,0	2—6	3—6	45—62	25—44	2—4
Свинья	0,3—0,8	4—12	3—6	25—35	40—50	2—5
Овца	0,0—1,0	1—4	2—4	40—48	40—50	2—6
Коза	0,0—0,2	2—8	5—20	20—40	40—70	2—5
Собака	0,0—1,0	3—9	1—6	43—72	21—40	1—5
Кошка	0,0—1,0	2—8	3—9	40—45	36—51	1—5
Курица	1,3—3,0	6—10	—	24—30	52—60	4—10

Появление в лейкограмме молодых и дегенеративных форм нейтрофилов (ядерный сдвиг нейтрофилов) — характерный признак, свойственный инфекционным и воспалительным процессам, злокачественным новообразованиям, различного рода интоксикациям. Различают регенеративный, дегенеративный и лейкемоидный ядерные сдвиги. При регенеративном сдвиге увеличивается содержание палочкоядерных и юных нейтрофилов, при дегенеративном — только палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов наряду с дегенеративными изменениями в клетках. Лейкемоидный сдвиг характеризуется появлением более незрелых форм (миелоцитов, промиелоцитов, миелобластов и др.).

Регенеративный сдвиг наблюдается главным образом при воспалительных и гнойно-септических процессах. Дегенеративный сдвиг — показатель функционального угнетения костного мозга, встречается при интоксикациях (сальмонеллез, острый перитонит, уремическая и диабетическая кома). Лейкемоидные сдвиги являются обычно отражением своеобразной реактивности больного организма при самых различных заболеваниях.

Базофилы — клетки крови диаметром 8—14 мкм, в цитоплазме их имеются крупные базофильные гранулы, содержащие гепарин. Ядро базофилов крупное сегментированное, окрашивается в фиолетово-розовый цвет. Они участвуют в иммунологических реакциях аллергического типа и процессах свертывания крови. В крови встречаются в небольшом количестве.

Увеличение содержания базофилов наблюдается при хроническом миелолейкозе, гипофункции щитовидной железы. *Уменьшение содержания базофилов* учесть трудно из-за малого их количества в крови.

Эозинофилы — клетки крови размером 8—20 мкм. Отличаются обильной крупной розовой зернистостью, заполняющей всю цитоплазму. Обладают некоторой фагоцитарной и двигательной активностью, участвуют в аллергических реакциях.

Эозинофилия — увеличение содержания эозинофилов. Наблюдают при паразитарных заболеваниях (трихинеллезе, описторхозе, аскаридозе, эхинококкозе и др.), ревматизме, хроническом миелолейкозе, лимфогранулематозе и других злокачественных новообразованиях, ожоговой болезни, обморожении. Появление эозинофилов при воспалительных и гнойно-септических процессах на фоне лимфоцитоза и незначительного ядерного сдвига нейтрофилов является предвестником благоприятного исхода заболевания.

Эозинопения — уменьшение содержания эозинофилов. Отмечают при сепсисе, тяжелых интоксикациях, в агональном состоянии.

Нейтрофилы (палочкоядерные и сегментоядерные) — лейкоцитарные клетки размером 7—15 мкм, обладающие выраженной защитной функцией, связанной с их фагоцитарной и двигательной активностью, способностью вырабатывать бактерицидные (лизоцим) и антитоксические вещества. Отличительный признак нейтрофилов — мелкая зернистость в цитоплазме. Ядро у молодых

клеток не сегментировано и напоминает изогнутую S-образной формы палочку (палочкоядерные нейтрофилы). В процессе созревания клеток ядро как бы перекручивается, образуя сегменты, соединенные тонкими нитями хроматина (сегментоядерные нейтрофилы). В окрашенных мазках крови цитоплазма нейтрофилов розово-серого цвета (слабооксифильная). Мелкая зернистость в цитоплазме у собак, кошек и свиней окрашивается в розово-фиолетовый цвет, у лошадей и жвачных она воспринимает кислые и основные красители.

Нейтрофилез (нейтрофилия) — увеличение содержания нейтрофилов (палочкоядерных, сегментоядерных). Отмечают при воспалительных процессах (пневмония, перитонит, пиелонефрит, септицемия, плеврит и др.), интоксикациях. Выраженный нейтрофильный лейкоцитоз с обнаружением молодых форм нейтрофилов, вплоть до промиелоцитов и миелобластов (сдвиг ядра влево), наблюдается при острых пневмониях, тяжелых инфекциях, остром гемолизе. Появление в крови незрелых нейтрофилов (миелоцитов, промиелоцитов, миелобластов) отмечается при миелолейкозе и других злокачественных поражениях (гемобластозах).

Нейтропения — снижение содержания в крови нейтрофилов. Признак падения сопротивляемости организма к инфекциям, воздействия на организм ионизирующей радиации, цитостатических препаратов. Нейтропения обычно совпадает с лейкопенией.

Лимфоциты — клетки крови диаметром от 4,5 до 18 мкм с округлым или овальным ядром, окрашенным в светло-синий или голубой цвет, цитоплазмой с видимым перинуклеарным просветлением (характерный признак). Различают малые, средние и большие лимфоциты. По иммунологическим функциям выделяют Т- и В-лимфоциты.

Лимфоцитоз — увеличение содержания лимфоцитов. Характерный признак хронического лимфолейкоза. Незначительный лимфоцитоз бывает при пневмонии, роже свиней, остеомиелите, сепсисе и некоторых других болезнях и указывает на фазу выздоровления. Лимфоцитоз при агранулоцитозе или лимфатической лейкемоидной реакции — неблагоприятный признак, свидетельствующий о снижении микрофагоцитарной функции организма вследствие истощения гранулопоэза.

Лимфоцитопения — уменьшение содержания лимфоцитов. Встречают при некоторых тяжелых инфекциях, воспалительных и гнойно-септических заболеваниях, и в прогностическом отношении она является неблагоприятным симптомом.

Моноциты — самые крупные клетки (диаметр 10—20 мкм) нормальной крови с круглым ядром бобовидной или подковообразной формы. В патологических случаях ядро может быть сегментировано. Структура ядра нежная сетчатая, в окрашенных мазках бледно-фиолетового цвета, может содержать мелкую зернистость, ва-

куоли, зерна пигмента и др. Моноциты фагоцитируют микробные тела, клеточные остатки, различные токсические продукты.

Моноцитоз — увеличение содержания моноцитов. Наблюдают при острых инфекционных заболеваниях, а также при туберкулезе, бруцеллезе, злокачественных опухолях и сепсисе.

Моноцитопения — уменьшение количества моноцитов. Бывает при тяжелых септических процессах и некоторых инфекционных болезнях.

Определение гематокрита с помощью микроцентрифуги. Оборудование: микроцентрифуга МЦГ-8; капиллярные трубки, имеющиеся в комплекте центрифуги (можно использовать капилляры для определения *С*-реактивного белка). Используют капиллярную или венозную кровь с ЭДТА или гепарином.

Ход определения. При взятии крови непосредственно от животного для предотвращения ее свертывания капилляры обрабатывают антикоагулянтом и высушивают. Если используют кровь с антикоагулянтом, то этого не делают. Заполняют капилляры на 7/8 длины кровью, закупоривают их с одного конца пластилином и помещают в ротор центрифуги так, чтобы закупоренные концы упирались в резиновую прокладку. Центрифугируют 5 мин при 6000 мин$^{-1}$. Определяют гематокритную величину по отсчетной шкале, приложенной к центрифуге.

Определение гематокрита с использованием пипеток Панченкова или градуированных. Оборудование: центрифуга; пипетки Панченкова или другие градуированные микропипетки.

Ход определения. В обработанную антикоагулянтом (или необработанную) пипетку Панченкова с отрезанным верхним концом набирают кровь точно до верхней метки, закупоривают ее, обтягивая резиновым кольцом, и центрифугируют 30 мин при 3000 мин$^{-1}$. Для каждой центрифуги устанавливают определенное время работы. Вычитают из 100 высоту столбика эритроцитов и получают гематокритную величину в процентах.

Подобным методом определяют гематокрит в пипетках или пробирках иного типа.

Нормальные величины гематокрита у взрослых животных указаны в приложениях 6 и 7. У молодняка гематокрит ниже, чем у взрослых животных, и имеет некоторую возрастную динамику.

Клиническое значение. Гематокрит — соотношение объема плазмы и форменных элементов крови, выраженное в процентах по объему. Увеличение гематокритной величины отмечают при анемиях и кровопотерях, уменьшение — при сгущении крови. Для объективной оценки лабораторных показателей крови определение гематокрита обязательно.

Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) микрометодом Панченкова. Принцип метода основан на использовании свойств крови, смешанной с раствором цитрата натрия, не свертыва-

ваться при стоянии, а разделяться на два слоя: нижний — эритроциты и верхний — плазму. Это расслоение происходит с различной скоростью в зависимости от изменения химических и физических свойств крови.

Реактив: 1,5%-ный раствор натрия цитрата трехзамещенного пятиводного. Раствор фильтруют, pH раствора нейтральный или слабощелочной. Реактив нестойкий, при помутнении раствор необходимо заменить.

Оборудование: пробирки размером 10 · 1 см; аппарат Панченкова, состоящий из штатива с гнездами и зажимами для специальных капиллярных пипеток с просветом канала 1 мм. На пипетках нанесена миллиметровая шкала длиной 10 см. Верхнее деление шкалы отмечено «0» и буквой «К» (кровь). Через каждые 10 делений стоят цифры 10, 20, 30 и т. д. до 100; против деления 50 — буква «Р» (реактив). Отверстия концов капиллярных пипеток, вставленных в прибор, герметически закрываются резиновыми прокладками или пробками, и кровь из пипетки не выливается. Капиллярные пипетки и пробирки должны быть хорошо промыты хромовой смесью.

Ход определения. В капиллярную пипетку, предварительно промытую раствором цитрата натрия, набирают этот раствор до метки «Р» и вводят в пробирки размером 10 · 1 см. Затем тем же капилляром набирают 2 раза кровь из ушной вены до метки «К» и вносят ее каждый раз в ту же пробирку. Хорошо смешивают, насасывают в капилляр до метки «0» и, заметив время, ставят в штатив. Через 1 ч отсчитывают по делениям капиллярной пипетки величину оставшегося столбика плазмы.

Расчет. Скорость оседания определяют за 1 ч. Для определения скорости оседания эритроцитов, гематокрита предложено несколько видов устройств. Фирма «Diesse Diagnostica Senese» (Италия) предлагает Vesmatic System — устройство одновременного определения СОЭ в 60 пробах по 1 мкл крови, содержащихся в пластиковых вакуумных пробирках VACUTEG. Фирма «Invitech Ltd» (Англия) выпускает прибор ESRPLUS, который способен определять одновременно в трех пробах капиллярной крови объемом 25 мкл каждая СОЭ, гематокрит, содержание общего билирубина, а также оценивать наличие липемии и гемолиза. Во всех случаях свежую капиллярную кровь исследуют непосредственно после взятия, венозную стабильную — в течение 12 ч при 2—8 °С.

Клиническое значение. Склеиванию эритроцитов крови препятствует их отрицательный заряд, вследствие чего они отталкиваются друг от друга. Ускорению оседания эритроцитов способствуют глобулины, фибриноген, мукополисахариды, содержание которых увеличивается при многих воспалительных процессах, инфекциях, злокачественных опухолях, нефрите и др.

При вертикальном положении пипетки Панченкова у здоровых животных СОЭ равна (мм/ч): крупный рогатый скот 0,5—1,5; овцы, козы 0,5—1,0; лошади 40—70; свиньи 2—9; собаки 2—6; куры 2—3.

Замедление СОЭ отмечается при диарее (тяжелой форме диспепсии молодняка), обильном потении, полиурии, механической и паренхиматозной желтухах, непроходимостях кишечника. Повышение СОЭ наблюдается при большинстве воспалительных процессов, инфекциях, злокачественных опухолях, коллагенозах, нефрите, анемиях.

Определение гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом. Принцип. Гемоглобин при взаимодействии с железосинеродистым калием окисляется в метгемоглобин (гемиглобин), образующий с ацетонциангидрином окрашенный гемиглобинцианид, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию гемоглобина. Кровь с антикоагулянтом хранят в течение 24 ч при 2—8 °С, 8 ч при комнатной температуре — 15—20 °С.

Реактивы: заводской набор реактивов;

трансформирующий раствор (ацетонциангидрин 0,5 мл, калий железосинеродистый 200 мг, натрий двууглекислый 1 г, дистиллированная вода до 1 л); стабилен при хранении в посуде из темного стекла в течение 3 мес, при появлении осадка или обесцвечивании раствор к употреблению не пригоден;

стандартный раствор гемиглобинцианида, соответствующий концентрации гемоглобина крови 15 г% при разведении крови в 251 раз.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; пипетки на 0,02 мл; колба мерная на 1 л.

Ход определения. В пробирку вносят 5 мл трансформирующего раствора и 0,02 мл крови (разведение в 251 раз), хорошо перемешивают, оставляют на 10 мин, после чего смесь измеряют на фотоэлектроколориметре при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы (трансформирующий раствор). Стандартный раствор измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Расчет гемоглобина (г%)проводят по формуле

$$Hb = E_{оп}/E_{ст} \times 15,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартного раствора; 15 — соответствие стандартного раствора концентрации гемоглобина крови при ее разведении в 251 раз.

Для перевода г% в г/л найденное число умножают на 10.

Метод Сали, предложенный еще в 1895 г., неточен и им в настоящее время пользоваться не рекомендуется.

Определение гемоглобина в крови возможно *с помощью бумажных полосок*, помещенных на пластиковых подложках в отражательные фотометры, выпускаемых фирмами «Эймс» (США) и др. Исследуемую пробу наносят на реакционную зону диагностической полоски и помещают в прибор, в котором она облучается полихроматическим светом, диффузионно отраженный свет собирается на измерительной системе и после прохождения через интерферирую-

щий фильтр измеряется, затем его сравнивают со стандартом. Система контролируется микропроцессором.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Гемоглобин — дыхательный пигмент крови, состоит из белка глобина и простетической группы — гема. Глобин по строению близок к альбумину, синтезируется в печени, представляет хелатный комплекс протопарферина с двухвалентным железом.

Основная функция гемоглобина — перенос кислорода от легких к тканям. Гемоглобин участвует в транспорте углекислого газа из тканей в легкие, в поддержании кислотно-основного равновесия в организме, т. е. обладает буферными свойствами. Он способен соединяться с оксидом углерода, образуя карбоксигемоглобин, а также с некоторыми химическими веществами с образованием метгемоглобина. Эти соединения не способны переносить кислород от легких к тканям.

Нормативы содержания гемоглобина у животных приведены в приложениях 5—7.

Снижение количества гемоглобина отмечается при дефицитных анемиях вследствие недостатка железа, меди, кобальта, витамина B_{12}, фолиевой кислоты, белков и других веществ, при хронических интоксикациях, гепатите, гепатозе и других болезнях печени, кетозе, расстройствах желудочно-кишечного тракта, инфекционных и инвазионных болезнях и других заболеваниях. Умеренное снижение гемоглобина отмечают при алиментарной (железодефицитной) анемии, более выраженное — при массовой кровопотере, гемолитической и гипопластической анемии.

Следует отметить, что снижение концентрации гемоглобина и количества эритроцитов не всегда протекает параллельно. Чаще количество гемоглобина уменьшается резче, чем число эритроцитов в крови. Однако при ряде заболеваний могут возникать противоположные сдвиги, поэтому необходимо одновременно определять цветовой показатель.

Повышение уровня гемоглобина отмечают при сгущении крови (диарея, обильное потоотделение), непроходимости кишечника, сильной мышечной нагрузке, нахождении животных на высоте 1400 м и выше над уровнем моря.

Определение цветового (цветного) показателя. Цветовой показатель — среднее содержание гемоглобина в одном эритроците. Он характеризует степень насыщения эритроцитов гемоглобином по сравнению с нормой. Цветовой показатель вычисляют путем деления концентрации гемоглобина в 1 мкл крови, выраженной в пикограммах (пк), на число эритроцитов в том же объеме крови.

Цветовой показатель определяют по формуле

$$x = \frac{3\text{Нв (г/л)}}{\text{Три первые цифры количества эритроцитов в 1 мкл}}.$$

Например, в 1 мкл крови содержится 4 500 000 эритроцитов, концентрация гемоглобина 120 г/л. В этом случае цветовой показатель будет равен $3 \cdot 120/450 = 0{,}8$.

В норме цветовой показатель равен 1 или близок к ней. Снижение его до 0,8 и ниже (гипохромия) свидетельствует о слабом насыщении эритроцитов гемоглобином, что отмечается при железодефицитной анемии. Увеличение цветового показателя выше 1 (гиперхромия) отмечается при B_{12}- и фолиеводефицитных, гипопластических анемиях. При острых кровотечениях, хронических лейкозах, некоторых гемолитических анемиях отмечается нормохромная анемия, при которой цветовой показатель близок к 1.

3.3. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

В клинической ветеринарии для оценки состояния обмена веществ, функции сердца, печени, почек, желудочно-кишечного тракта, эндокринных и других органов, для диагностики различных болезней используют множество биохимических методов исследования крови, мочи, молока, рубцового содержимого и других субстратов. При этом особое значение имеет исследование крови, так как оно позволяет оценить состояние обмена веществ на различных его стадиях.

Стадии метаболизма. Под метаболизмом (обмен веществ) понимают совокупность процессов превращения веществ и энергии в организме, обеспечивающих его жизнедеятельность во взаимосвязи с внешней средой. Обмен веществ и энергии включает четыре стадии.

Первая стадия метаболизма — пищеварение. В эту стадию у моногастричных животных белки корма под действием протеолитических ферментов желудка расщепляются до аминокислот. Липиды под действием липаз и желчных кислот расщепляются до жирных кислот и глицерола (глицерина). Углеводы (ди- и полисахариды) под влиянием амилаз превращаются в моносахариды.

У жвачных животных белки корма в преджелудках (в основном в рубце) под действием ферментов микрофлоры расщепляются до аминокислот и аммиака, которые частично всасываются, а в большей степени усваиваются микрофлорой и используются для синтеза микробного белка. Бактерии и инфузории отмирают, попадают в сычуг и кишечник, где бактериальный белок расщепляется до аминокислот. Протеолиз и дезаминирование аминокислот в рубце происходят с высокой скоростью. При недостатке энергии синтез микробного белка задерживается, аммиак не полностью усваивается микрофлорой, поступает в повышенных количествах в кровь и печень, вызывает нарушение функций важнейших органов и систем, прежде всего дистрофию печени и почек. Липиды корма в рубце расщепляются до летучих жирных кислот (ЛЖК). Углеводы

корма сбраживаются до ЛЖК (уксусной, масляной, пропионовой и др.). Уксусная и масляная кислоты являются основными источниками синтеза жира, в том числе жира молока. Пропионовая кислота — основной источник глюкозы. В свою очередь, исходным материалом для пропионовой кислоты служит молочная кислота, которая образуется в процессе сбраживания легкоусвояемых углеводов — сахара и крахмала. Потребность жвачных в глюкозе практически полностью (90 % и более) зависит от структуры рациона, обеспечивается глюконеогенезом. Источниками при этом являются пропионат, глицерол, аминокислоты, лактат с пируватом (А. А. Алиев, 1997). Поэтому для животных этих видов важно поддерживать в рационах оптимальное сахаро-протеиновое отношение (0,8—1,2).

Вторая стадия метаболизма включает в себя всасывание аминокислот, частично аммиака у жвачных животных, жирных кислот, глицерола, ЛЖК, моносахаридов (глюкоза, лактоза, фруктоза, маноза) и их транспорт кровью и лимфой к органам и тканям. В эту же стадию осуществляется трансмембранный перенос продуктов распада белков, углеводов и липидов в клетки разных тканей и органов.

Третья стадия метаболизма осуществляется в тканях и органах. В эту стадию происходит синтез белков, липидов, моносахаридов, липопротеинов и других веществ с потреблением энергии; окислительно-восстановительный распад белков до аминокислот, липидов — до жирных кислот и глицерола, ди- и полисахаридов — до моносахаридов. Основным промежуточным продуктом распада липидов, углеводов и частично белков является ацетил-КоА, который вступает в цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), образуя различные продукты обмена.

Четвертая стадия метаболизма включает в себя выделение конечных продуктов обмена веществ. Конечные продукты обмена азотсодержащих веществ — мочевина, мочевая кислота, аммиак, креатин, креатинин, аминокислоты и др., метаболизма углеводов и липидов — CO_2 и H_2O. Минеральные вещества экскретируются в основном с мочой и калом.

На второй и третьей стадиях метаболизма осуществляется энергетический обмен — высвобождение, запасание и использование энергии. На стадиях окислительно-восстановительного распада белков, липидов и углеводов с образованием ацетил-КоА, его превращения в ЦТК высвобождается энергия химических связей. Она затрачивается в последующем на эндогенный синтез различных веществ. Аденозинтрифосфорная кислота (АТФ), образовавшаяся из аденозиндифосфорной кислоты и неорганического фосфора, используется как источник энергии для всех видов работ, производимых организмом.

Обмен веществ осуществляется благодаря многочисленным ферментным реакциям, регулируется нейроэндокринной системой, находится под постоянным контролем автоматической само-

регуляции, в основе которой лежит принцип обратной связи. Концентрация веществ в клетке регулирует направленность химических процессов.

Регуляторные системы поддерживают обмен веществ на определенном уровне, обеспечивают гомеостаз — относительное динамическое постоянство внешней среды (крови, лимфы, тканевой жидкости) и устойчивость основных физиологических функций организма.

Нарушение обмена веществ может быть на любой или на всех стадиях метаболизма, что должно учитываться при определении наиболее информативных биохимических показателей.

3.3.1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО РАВНОВЕСИЯ (КОР)

Постоянство равновесия pH в организме поддерживается четырьмя основными буферными системами — гемоглобиновой, бикарбонатной, фосфатной и белковой. Перечисленные буферные системы представляют собой смесь слабой кислоты и соли этой кислоты. Благодаря им обеспечивается перемещение ионов от мест их образования к местам выделения почками, легкими без нарушения pH крови. pH крови постоянный (7,35—7,45), и изменение его выше 7,8 и ниже 6,8 несовместимо с жизнью; в клинической практике не наблюдается.

Кислотно-щелочное состояние, кроме pH, характеризуется показателями буферных систем, в первую очередь бикарбонатной как наиболее лабильной (время реакции — 30 сек). Бикарбонатная буферная система представлена слабой угольной кислотой (H_2CO_3) и ее солью ($NaHCO_3$).

Состояние КОР оценивают по следующим показателям крови:

pH — актуальная величина pH артериальной, капиллярной или смешанной венозной крови определяется без доступа воздуха при температуре 37 °С (норма 7,35—7,45);

pCO_2 — актуальное pCO_2 определяется без доступа воздуха (норма артериальной крови 35—45 мм рт. ст., венозной — 46—58 мм рт. ст.);

AB — актуальное (истинное) содержание бикарбоната в плазме, рассчитанное при истинном pCO_2 и истинном насыщении крови кислородом (норма 19—25 ммоль/л);

SB — стандартный бикарбонат — рассчитанное содержание бикарбоната в плазме при насыщении крови кислородом 100 %, pCO_2 = 40 мм рт. ст. и при температуре 37 °С (артериальная кровь 20—27 ммоль/л, венозная — 20—29 ммоль/л);

BE-B — рассчитанный истинный избыток оснований крови, измеряется в ммоль/л;

BB — буферные основания — связующее звено между КОР и электролитами, непосредственно участвующее в поддержании за-

кона электронейтральности. Сумма бикарбоната и белка составляет 45—50 ммоль/л. Она остается неизменной при дыхательных расстройствах;

BE — избыток или дефицит оснований. Показывает, сколько ммоль кислоты или основания следует добавить в 1 л внеклеточной жидкости для восстановления нормального pH (от −3,4 до +1,4 ммоль/л);

pO_2 — напряжение кислорода, отражает концентрацию растворенного в плазме O_2 (pO_2 артериальной крови 72—105 мм рт. ст.).

Определение перечисленных показателей проводится на специальных приборах в стационарных условиях. Для определения КОР, калия, натрия, хлора, глюкозы лактата предложены анализаторы ABL поколения 500, 600, 700 (Дания), NOVA стат-профили 2—11 (Австрия), анализаторы газов крови серии 800 (Германия), IL серии 1300 (США).

В настоящее время на российском рынке достаточно фирм, выпускающих анализаторы для определения КОР крови (ЭЦ-60 и др.). В ветеринарии анализаторы КОР используются крайне редко.

Состояние бикарбонатной буферной системы проводят по определению в плазме крови резервной щелочности. Под резервной щелочностью понимают запас бикарбонатов крови, определяемый по общему CO_2. Известно, что углекислый газ в основном содержится в составе бикарбонатов крови и только 1/20 его часть находится в растворенном и свободном состоянии. Такая малая доля существенно не влияет на оценку состояния бикарбонатной системы по общему CO_2.

3.3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗЕРВНОЙ ЩЕЛОЧНОСТИ КРОВИ ДИФФУЗНЫМ МЕТОДОМ ПО И. П. КОНДРАХИНУ

Принцип метода. В одной половине колбы плазму крови обрабатывают серной кислотой, в результате чего выделяется углекислый газ, входящий в состав бикарбонатов. Выделившийся углекислый газ поглощается раствором натрия гидроксида, который находится в другой половине колбы. Избыток натрия гидроксида, не вошедший в реакцию с углекислым газом, и половину натрия гидрокарбоната (Na_2CO_3), образовавшегося в процессе поглощения CO_2, оттитровывают раствором серной кислоты. По количеству первоначально связанного натрия гидроксида определяют количество выделенного из плазмы углекислого газа, которое эквивалентно содержанию бикарбонатов.

Реактивы: 0,1 н. (0,05 моль/л) раствор серной кислоты (готовят из фиксанала);

0,02 н. (0,01 моль/л) (точно) раствор серной кислоты (готовят из 0,1 н. раствора серной кислоты); 0,1 н. (0,1 моль/л) раствор натрия гидроксида;

0,02 н. (0,02 моль/л) раствор натрия гидроксида (готовят из 0,1 н. раствора натрия гидроксида). Титр этого раствора проверяют перед анализом и доводят до нужной величины;

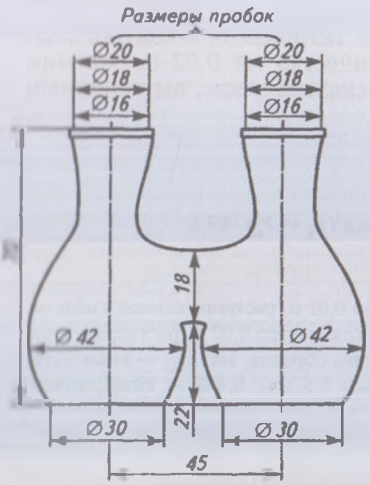


Рис. 1. Прибор для определения резервной щелочности крови

5 %-ный раствор серной кислоты;

1 %-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Оборудование: сдвоенные колбы с резиновыми пробками (рис. 1). Они должны быть хорошо вымыты без следов щелочи и кислоты; микробюретки на 2 и 5 мл; центрифужные пробирки.

Ход определения. В чистые сухие центрифужные пробирки вносят 0,5—1,0 мл вазелинового масла, 1—2 капли 1%-ного раствора гепарина. Кровь берут из яремной вены в подготовленную пробирку под слой вазелинового масла, закрывают пробкой, осторожно перемешивают. В лаборатории центрифугируют ее при 3000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин. Плазму крови хранят в бытовом холодильнике при температуре 4 °С. Анализ проводят в течение 8—12 ч после взятия образца крови.

По количеству проб крови с учетом параллельных исследований подбирают сдвоенные колбы и три сдвоенные колбы оставляют для контроля. Точность результатов всей серии исследований полностью зависит от точности титрования раствора натрия гидроксида в контрольных колбах. Все колбы закрывают резиновыми пробками.

Анализы проводят серийно. В одну из каждой пары сдвоенных колб, поочередно открывая, вносят с помощью пипетки и шприца или резиновой груши по 2 мл 0,02 н. раствора натрия гидроксида и плотно закрывают пробкой. В смежную колбу, кроме контрольных, опять поочередно открывая и закрывая, вносят 0,5 мл плазмы крови, находящейся под вазелиновым маслом. После этого в колбы с плазмой (контрольные без плазмы), также поочередно открывая, вносят из пипетки (не выдувая) по 1 мл 5%-ного раствора серной кислоты и быстро плотно закрывают пробкой. Проверяют, хорошо ли закрыты колбы, осторожно вращательными движениями перемешивают плазму крови с кислотой и оставляют стоять в течение 4 ч. Перемешивают плазму с кислотой не менее 3 раз.

Через 4 ч приступают к титрованию. Для этого поочередно открывают колбу, где находится раствор натрия гидроксида, вносят туда 1—2 капли раствора фенолфталеина и титруют из микробюретки на 2 мл 0,02 н. раствором серной кислоты до полного обес-

цвечивания раствора. Опытные и контрольные пробы титруют с одинаковой скоростью.

Р а с ч е т. По разнице результатов титрования в контрольных и опытных образцах определяют количество мл 0,02 н. раствора натрия гидроксида, связанного с углекислым газом, вытесненным из бикарбонатов плазмы.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{(V_к - V_п) \cdot 0{,}448}{V_{пл}} \cdot 100, \text{ или } (V_к - V_п) \cdot 89{,}6,$$

где x — количество CO_2, об.%; $V_к$ — количество 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшего на титрование контроля, мл; $V_п$ — количество 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшего на титрование исследуемого образца, мл; $V_{пл}$ — количество плазмы крови, мл (в методике принято равным 0,5 мл); 0,448 — коэффициент пересчета 0,02 н. раствора натрия гидроксида на CO_2 в условиях данной реакции; 100 — коэффициент для пересчета результатов анализа на 100 мл плазмы крови.

В конечном счете разницу количества (мл) 0,02 н. раствора серной кислоты, пошедшего на титрование контрольного и опытного образцов, умножают на коэффициент 89,6 и получают конечный результат в об.% CO_2. Ошибка метода составляет ±3 %.

Источники: 29, 34.

Нормативы величины резервной щелочности плазмы крови животных представлены в приложениях 5 и 6.

Снижение резервной щелочности крови свидетельствует о сдвиге кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза, повышение — в сторону алкалоза.

Метаболический ацидоз отмечают при однотипном высококонцентратном или силосо-жомовом кормлении, кетозе, вторичной остеодистрофии, ацидозе рубца, сахарном диабете, расстройствах желудочно-кишечного тракта, особенно при диарее молодняка, сердечной недостаточности, миоглобинурии, гипоксии, нефрите, почечной недостаточности, септических процессах и т. д. *Респираторный ацидоз* бывает вследствие замедления процесса отдачи углекислоты легкими. Такое явление наблюдается при расстройстве сердечной деятельности, отеке легких, тяжелой пневмонии, угнетении дыхательного центра, нахождении животных в среде с высокой концентрацией углекислоты в воздухе.

Состояние *метаболического алкалоза* у животных бывает при алкалозе рубца, введении в организм больших доз пищевой соды. *Респираторный алкалоз* наблюдается при усиленной гипервентиляции легких, вследствие выведения из организма большого количества углекислого газа, а также при содержании животных на большой высоте.

3.3.3. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО И МИНЕРАЛЬНОГО ОБМЕНОВ

Состояние водно-электролитного обмена оценивают по содержанию в крови натрия, калия, кальция, фосфора, магния, хлора.

Определение калия и натрия в биологических жидкостях методом пламенной фотометрии. В современных биохимических лабораториях измерение концентрации натрия и калия в биологических жидкостях проводится одновременно пламенной фотометрией или ионометрией.

Пламенная фотометрия представляет собой один из видов эмиссионного спектрального анализа, основанного на фотометрировании излучения элементов в пламени.

Принцип. Анализируемый раствор в виде аэрозоля вводят посредством специального распылителя, действующего под давлением сжатого воздуха, в пламя горелки, работающей на горячем газе (пропане, метане, бутане). В пламени молекулы распадаются на отдельные ионы, их электроны переходят из одного квантового состояния в другое, результатом чего является испускание кванта света. Натрий и калий способны интенсивно излучать свет в сравнительно низкотемпературном пламени, образованном сгоранием горючего газа в воздухе. Возникшее в пламени излучение определяемого элемента отделяется посредством светофильтров от излучения других элементов и, попадая на фотоэлемент, вызывает фототок, интенсивность которого измеряется гальванометром.

Натрий окрашивает пламя в ярко-желтый цвет, калий — в слабый красно-фиолетовый. Добавление к распыленным растворам органических красителей, являющихся поверхностно-активными веществами, увеличивает яркость свечения пламени.

Реактивы: основные калибровочные растворы для определения натрия, калия в плазме (сыворотка), спинномозговой жидкости, экссудатах, транссудатах, желудочном содержимом и эритроцитах. Готовят их из химически чистых солей: натрия хлорида, калия хлорида, кальция карбоната, дважды перекристаллизованных и высушенных до постоянной массы:

стандартный раствор натрия основной: 2,5418 г натрия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, растворяют в 1 л бидистилированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг натрия;

стандартный раствор калия основной: 1,9069 г калия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 105 °С, растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл раствора содержится 1 мг калия;

2,4972 г кальция карбоната растворяют в 50 мл 1 н. (1 моль/л) раствора соляной кислоты в мерной колбе на 1 л и доводят бидистиллированной водой до метки.

Оборудование: пламенный фотометр отечественного или зарубежного производства; компрессор; колбы мерные; бюксы

диаметром 10—15 см; баллоны с пропаном, метаном или бутаном; флаконы пенициллиновые.

Подготовка материала к анализу. *Плазму* получают в течение 1 ч после отбора проб крови. В качестве антикоагулянта используют 1%-ный раствор гепарина из расчета 2 капли на 10 мл крови. Кровь центрифугируют в течение 15 мин при 3000 мин$^{-1}$.

Плазма крови не должна иметь даже следов гемолиза. Любой гемолиз исключает выполнение анализа. В герметически закрытой пробирке сыворотку или плазму можно хранить при температуре 20—25 °С и 4—8 °С в течение 1 нед, при минус 20 °С в течение 1 года (W. Guder и соавт., 1996).

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

Для определения натрия плазму крови разводят 1 : 100, для чего берут 1 мл разведенной 1 : 20 плазмы, вносят в другой флакончик и приливают 4 мл дистиллированной воды. Можно готовить разведение плазмы 1 : 150.

Эритроциты. Гепаринизированную кровь центрифугируют в течение 40—45 мин при 3000 мин$^{-1}$. Затем плазму с верхним слоем эритроцитов отсасывают. Эритроциты набирают пипеткой из нижней части пробирки, разводят дистиллированной водой. Соотношение эритроцитов и воды подбирают в зависимости от предполагаемого содержания калия и натрия.

Желудочное содержимое предварительно разводят дистиллированной водой 1 : 50, а затем добавляют дистиллированную воду до разведения 1 : 10. Пересчитывают полученные результаты на разведение.

Ход определения. Определение ведут согласно инструкции, прилагаемой к прибору. При включении прибора сначала пропускают сжатый воздух, затем ацетилен или другой газ. В бюксы диаметром 10—15 см вносят подготовленную биологическую жидкость и соответствующий рабочий калибровочный раствор. Исследование начинают с настройки прибора.

Во время прогревания прибора в пламя горелки подают дистиллированную воду и при помощи корректора устанавливают шкалу гальванометра на «0». В распылитель подают рабочие стандартные растворы (каждый не менее 2 раз) и записывают показания прибора.

Капилляр промывают дистиллированной водой и в пламя горелки подают исследуемые пробы также не менее 2 раз. Показания прибора заносят в журнал исследований. Через каждые 5—6 проб распылитель промывают дистиллированной водой до тех пор, пока шкала гальванометра не установится на «0», и подают в распылитель рабочие стандартные растворы, в пределах которых укладываются показания исследуемых проб.

После окончания исследования капилляр распылителя промывают 20 мин дистиллированной водой, отключают газ, а затем воз-

дух, выключают прибор из электросети, закрывают диафрагму и фотоэлемент, снимают светофильтры.

Р а с ч е т ведут по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из основных калибровочных растворов готовят рабочие растворы, как указано в таблицах 6—9. Рабочие калибровочные растворы обрабатывают как опытные пробы и по полученным данным строят калибровочный график.

6. Рабочие калибровочные растворы для определения калия в плазме, спинномозговой жидкости, транссудате, экссудате и желудочном содержимом

Основные калибровочные растворы, мл			Дистиллированная вода, мл	Концентрация калия в калибровочном растворе	
KCl	NaCl	$CaCO_3$		мг%	ммоль/л
1,2	16,5	0,2	82,1	12	3,08
1,6	16,5	0,4	81,5	16	4,10
2,0	16,5	0,5	81,0	20	5,12
2,4	16,5	0,6	80,5	24	6,15
2,8	16,5	0,8	79,9	28	7,18

7. Рабочие калибровочные растворы для определения калия в эритроцитах

Основной калибровочный раствор KCl, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация калия			
		в калибровочной пробе		в эритроцитах	
		мг%	ммоль/л	мг%	ммоль/л
1,0	До 100	1,0	0,256	260	66,6
1,1	»	1,1	0,282	286	73,3
1,2	»	1,2	0,307	312	80,0
1,3	»	1,3	0,333	338	86,0
1,4	»	1,4	0,359	364	93,0
1,5	»	1,5	0,384	390	100,0
1,6	»	1,6	0,412	416	106,6

8. Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в плазме, спинномозговой жидкости, транссудате, экссудате и желудочном содержимом

Основной калибровочный раствор NaCl, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация натрия в калибровочной пробе	
		мг%	ммоль/л
2,6	97,4	260	113,0
2,8	97,2	280	121,7
3,0	97,0	300	130,4
3,4	96,6	340	147,6
3,8	96,2	380	165,2
4,0	96,0	400	174,3
4,2	95,8	420	182,6

9. Рабочие калибровочные растворы для определения натрия в эритроцитах

Основные калибровочные растворы, мл		Дистиллированная вода, мл	Концентрация натрия			
			в калибровочной пробе		в эритроцитах	
NaCl	K_2SO_4		мг%	ммоль/л	мг%	ммоль/л
0,4	14	До 100	0,4	0,174	10,4	4,52
0,5	14	»	0,5	0,217	13,0	5,65
1,0	14	»	1,0	0,434	26,0	11,3
1,5	14	»	1,5	0,652	39,0	16,9
2,0	14	»	2,0	0,869	52,0	22,6
2,5	14	»	2,5	1,086	65,0	28,2

Концентрация калия и натрия в биологической жидкости, ммоль/л, равна CK, где C — концентрация калия (натрия) в ммолях, найденная по калибровочному графику; K — разведение биологической жидкости.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Нормативы содержания калия и натрия в крови здоровых взрослых животных приведены в приложении 5. У собак, кошек и овец содержание калия в эритроцитах в 2,5—3 раза выше, чем в плазме, у большинства моногастричных животных — в 20 раз и более.

Концентрация калия в плазме крови новорожденных животных несколько выше, чем у взрослых. Натрий в основном внеклеточный элемент, более 80 % его находится во внеклеточном пространстве. Однако у собак и жвачных животных содержание его в эритроцитах преобладает над калием, у остальных животных — наоборот.

Натрий имеет основное значение в поддержании осмотического давления внеклеточной жидкости, является важным компонентом буферных систем, играет важную роль в поддержании жизнедеятельности микрофлоры рубца.

Изменение концентрации натрия и калия в крови вызывает нарушение кислотно-щелочного равновесия. Потеря натрия в организме сопровождается дегидратацией. Установлено, что при уменьшении содержания натрия до 115—130 ммоль/л, когда осмотическая концентрация понижается до 250—280 ммоль/л, развивается тяжелое состояние. Уменьшение или увеличение количества натрия в организме сопровождается подобным изменением содержания в нем воды, поэтому обессоливание и обезвоживание почти всегда понимают как синонимы.

Снижение количества натрия в плазме крови отмечают при длительном солевом голодании, поступлении с кормом большого количества калия, заболеваниях почек, сопровождающихся потерей натрия, чрезмерном потоотделении, сахарном диабете, поносах,

обильном поении, недостаточности коры надпочечников, регидратации организма большим количеством жидкости, не содержащей натрия. Гипонатриемия может наблюдаться при лихорадочном состоянии, пневмониях, хроническом нефрите.

Повышение содержания натрия в плазме крови наблюдают при повышенном диурезе, ограничении питья, несахарном диабете, поносе без возмещения жидкости, недостатке калия, гиперфункции коры надпочечников и др. Усиленное выделение натрия с мочой бывает при нефрите.

Снижение количества калия в крови (гипокалиемия) отмечается при усиленном выделении его с мочой (гиперфункция коры надпочечников и передней доли гипофиза), при диарее, больших внутривенных и внутрибрюшных вливаниях жидкости, не содержащей калия. Уровень содержания калия в крови и тканях не всегда тождествен: при уменьшении количества калия в тканях уровень этого элемента в крови может быть высоким. Такое явление бывает при сгущении крови, когда наступает относительная гиперкалиемия.

Гипокалиемия часто наблюдается при токсикозах у новорожденных животных, тяжелых формах диспепсии, сопровождаемых выраженным ацидозом. Снижение калия в крови наблюдается при сахарном диабете, введении инсулина, больших количеств растворов глюкозы, поваренной соли.

Гиперкалиемия наблюдается при поедании большого количества молодой травы или зеленой массы растений, выращенных на обильно удобренных калийными удобрениями угодьях, т. е. при пастбищной тетании. Она может быть следствием ацидоза, когда водородные ионы переходят из плазмы в клетки, обмениваясь на калий. Повышение калия в крови может быть следствием поражения почек, которые не могут выводить все поступающие с кормом электролиты.

Примечания. 1. Ведущие изготовители пламенных фотометров — фирмы «Radiometer» (Дания), выпускает анализаторы FLM3 и FLM3-0, и «Instrumentation Laboratay» (США), производит прибор IL-943. Эти приборы позволяют проводить измерения сыворотки, плазмы и мочи. Фирмы производят калибровочные растворы с нулевым и стандартным содержанием электролитов (обычно 140 ммоль/л натрия и 5,0 ммоль/л калия), с помощью которых проводится настройка и калибровка прибора. 2. Для определения натрия можно использовать гепарин, не содержащий натрий. Следует избегать гемолиза, поскольку разрушение эритроцитов вызывает выход из них калия и приводит к завышению результатов.

Источники: 50, 52.

Определение натрия и калия в биологических жидкостях с использованием ионоселективных анализаторов. В настоящее время в связи с производством ионоселективных электродов появились созданные на их основе ионоселективные анализаторы, позволяющие определять натрий и калий в биологических субстратах.

В России ионоселективный анализатор натрия и калия ЭЦ-59 выпускает фирма «Юнимед». Зарубежные фирмы «Radiometer» (Дания), «Nova bimedical» и «Becman-Couter» (США), «AVL» (Австрия) и многие другие производят ионометры, предназначенные для измерения концентрации натрия и калия в биологических жидкостях. Анализаторы выгодно отличаются от пламенных фотометров компактностью, бесшумной работой, безопасностью (не используется горючий газ), быстродействием (анализ проводится в течение 30—90 с), наличием автоматической самокалибровки через определенные интервалы времени. Фирмы выпускают различные модификации анализаторов газов крови со встроенными в них ионоселективными электродами для определения содержания натрия, калия, ионизированного кальция и хлоридов в одной пробе одновременно.

Определение натрия, калия и других элементов на ионоселективных анализаторах или ионометрах проводят по инструкциям, прилагаемым к соответствующему прибору. Принцип их работы общий. Электрическая схема состоит из индикаторного ионоселективного чувствительного к определенному иону электрода, электрода сравнения, прибора для измерения электродвижущей силы анализируемого раствора.

Если в раствор, содержащий ионы, поместить соответствующий индикаторный электрод, на его поверхности возникает электрический потенциал. Для измерения величины его в исследуемый раствор помещают электрод сравнения, потенциал которого не меняется, для чего электрод сравнения заполняют электролитом (раствором соли) постоянного состава. Для обеспечения контакта электролита с анализируемым раствором используют пористую мембрану. Разность потенциалов индикаторного электрода и электрода сравнения отражает активность исследуемого иона. Для системы, в которой ионная сила раствора поддерживается относительно постоянной, активность определенного иона соответствует его концентрации. При измерении содержания иона, принимающего участие в реакции на поверхности индикаторного электрода, меняется электродвижущая сила цепи.

Источник: 28.

Методы определения кальция, фосфора, магния. Для оценки состояния минерального и водно-электролитного обменов проводят определение в крови общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора и магния, а также используют показатели активности щелочной фосфатазы, парат-

гормона, кальцитонина и других веществ, непосредственно связанных с минеральным обменом.

Определение общего кальция в сыворотке крови комплексонометрическим методом с индикатором флуореконом (по Вичеву, Каракашеву). Принцип. Использование флуорексона для комплексонометрического определения кальция основано на том, что его водные растворы в сильно щелочной среде не флуоресцируют, но в этих же условиях флуорексон образует с кальцием флуоресцирующие комплексы.

Комплекс индикатора с металлом менее прочен, чем комплекс металла с трилоном Б, поэтому по мере добавления трилона Б к раствору, содержащему металл и индикатор, ионы металла постоянно переходят к трилону Б. При титровании трилоном Б в точке эквивалентности отмечается резкое «затухание» флуоресценции.

Реактивы: 0,1 н. раствор трилона Б (ЭДТА). Готовят из стандарт-титра;

0,005 н. раствор трилона Б. Готовят из 0,1 н. раствора трилона Б: 10 мл 0,1 н. раствора трилона Б в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 200 мл. Устойчив 2 мес;

индикаторная смесь: индикатор флуорексон (ч. д. а.) и калий хлорид (ч. д. а., х. ч.) в соотношении 1 : 100;

1 н. раствор калия гидроксида (ч. д. а., х. ч.). Допускается примесь кальция не более 1 мг%;

стандартный 100 мг%-ный раствор кальция: 2,497 г кальция карбоната (х. ч.), высушенного до постоянной массы при 100—120 °С, вносят в мерную колбу на 1 л, добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты и после растворения соли доводят объем бидистиллированной водой до метки. 1 мл раствора содержит 1 мг кальция;

рабочий 10 мг%-ный раствор кальция. Готовят разведением 100 мг%-ного раствора кальция дистиллированной водой 1 : 10 (1 мл 100 мг%-ного раствора кальция и 9 мл воды). Рабочий раствор кальция необходим для установления «затухания» флуоресценции при титровании и контрольной проверке метода.

Оборудование: микробюретка емкостью на 2 мл с градуировкой на 0,01 мл, оканчивающаяся вытянутым капилляром с оттянутым концом, что дает возможность проводить титрование меньшими каплями; пипетки емкостью на 1 и 10 мл; стаканчики для титрации (лучше полистироловые).

Посуду перед использованием выдерживают в разведенных растворах трилона Б и многократно промывают бидистиллированной водой.

Ход определения. В стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора калия гидроксида и несколько кристалликов индикаторной смеси. Появляется флуоресценция, обусловленная присутствием в приготовленной смеси кальция.

Для связывания кальция в смесь из микробюретки добавляют по каплям раствор трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания. Обычно для этого тре-

буется одна капля раствора трилона Б. Большее количество свидетельствует о высокой концентрации кальция в растворе калия гидроксида и его непригодности для анализа. Примесь кальция в растворе может быть обусловлена некачественной подготовкой посуды или неисправностью дистиллятора.

После связывания кальция, находящегося в растворе натрия гидроксида, в этот же стаканчик добавляют 0,5 мл сыворотки крови и снова оттитровывают раствором трилона Б до исчезновения флуоресценции и появления бледно-розового окрашивания.

Расчет ведут по формуле $Ca = a \cdot 20$, где a — количество раствора трилона Б, пошедшее на титрование сыворотки крови, мг%; 20 — коэффициент для пересчета в мл при условии, что титр 0,005 н. раствора трилона Б равен 1. Для перевода мг% в ммоль/л полученную величину делят на 4 или в качестве коэффициента берут не 20, а 5.

Примечания. Используют сыворотку, свободную от гемолиза, липемии, не желтушную. Венозную кровь отстаивают при комнатной температуре в течение 30—60 мин до полного образования сгустка или помещают в термостат при 37 °С на 30—60 мин. В закрытой пробирке сыворотку можно хранить 7 дней при температуре 4—5 °С. Ложнозавышенные результаты вызывают билирубин и ионы меди в методах титрования с ЭДТА, корковые пробки, гемоглобин, липемия, оксалаты.

Определение общего кальция в сыворотке крови комплексоном Арсеназо III. Принцип. Арсеназо III — металлокомплексон из группы диазокомплексообразователей, которые имеют неодинаковое сродство к различным ионам металлов. Наибольшее сродство проявляется к ионам Th, UO_2^{2-}, Zr, Pu, меньшее — к ионам Ba, Ca, Sr. Из этих ионов в сыворотке крови в значительном количестве присутствует только ион Ca. При смешивании раствора Арсеназо III и сыворотки крови образуется комплекс кальция с Арсеназо III, который характеризуется поглощением излучения с максимумом 650—670 нм. Интенсивность поглощения прямо пропорциональна концентрации кальция в диапазоне 0,5—3,5 ммоль/л.

Реактивы: Арсеназо III (ч. д. а.);
натрия додецилсульфат (ч.); ледяная уксусная кислота (х. ч.);
натрия ацетат (ч. д. а.);
кальция карбонат безводный (ч. д. а.);
соляная кислота (ч. д. а.).

Рабочие растворы реактивов: 0,1 моль/л ацетатный буфер с pH 4,75. Для приготовления 1 л буфера смешивают 454 мл 0,1 моль/л уксусной кислоты и 500 мл 0,1 моль/л натрия ацетата трехводного. Для приготовления 0,1 моль/л уксусной кислоты 2,86 мл кислоты (d = 1,05 г/см^3, 17,5 н.) вносят в мерную колбу на 500 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. Для приготовления 0,1 моль/л раствора натрия ацетата трехводного

6,8 г соли растворяют дистиллированной водой в стаканчике, затем переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой;

стандартный 2,5 ммоль/л раствор кальция: 25 мг кальция углекислого безводного (ч. д. а.) в мерной колбе на 100 мл растворяют 5 мл 0,1 н. соляной кислоты (готовят из фиксанала) и доводят объем до метки дистиллированной водой;

рабочий реактив Арсеназо III; 0,3 ммоль/л Арсеназо III в 0,1 моль/л ацетатном буфере с pH 4,75. Для приготовления 250 мл рабочего реактива 62 мг Арсеназо III растворяют в 250 мл ацетатного буфера, к полученному раствору добавляют 250 мг натрия додецилсульфата (до 0,1 %).

Оборудование: фотоэлектроколориметр; пробирки полистироловые; пипетки вместимостью 0,1 и 5 мл.

Ход определения. К 5 мл рабочего реактива Арсеназо III добавляют 50 мкл сыворотки (соотношение 1 : 100), смешивают, избегая образования пены. Через 2 мин и позже измеряют оптическую плотность образцов сыворотки крови против рабочего реактива Арсеназо III в кювете с толщиной слоя жидкости 10 мм при длине волны 590 нм. Параллельно готовят стандартную пробу аналогично опытной, но вместо сыворотки добавляют 50 мкл стандартного раствора кальция с содержанием 2,5 ммоль/л.

Концентрацию кальция (Са, ммоль/л) в сыворотке крови рассчитывают по формуле

$$Ca = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 2{,}5,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; 2,5 — коэффициент для пересчета в ммоль/л.

Примечания. 1. Исследуемая сыворотка не должна содержать следов гемолиза, алиментарной гиперлипидемии. 2. Исследование сыворотки крови проводят в течение первых суток после получения при хранении при температуре не более 4 °С. 3. Посуда для определения кальция должна быть химически чистой. Желательно использовать не стеклянную, а полистироловую посуду.

Источник: метод изложен в описании А. И. Овсянникова, С. А. Конькова, В. К. Гуркало. Измерение содержания кальция в сыворотке крови и других биологических жидкостях комплексоном Арсеназо III [(Клиническая лабораторная диагностика. — Киев, 1999, № 1. — С. 16—18 с изменениями, внесенными М. Л. Лизогубом, Н. Н. Куевдой (Крымский АТУ)]. В описанную методику внесены следующие изменения: концентрация Арсеназо III увеличена до 0,3 ммоль/л вместо 0,15 ммоль/л; в качестве детергента использован натрия додецилсульфат, концентрация которого 0,1 % вместо 0,04 %; определение кальция проводилось в сыворотке крови животных.

Определение общего кальция в сыворотке крови с индикатором мурексидом. Принцип. Мурексид в щелочной среде образует с кальцием непрочное соединение розового цвета. При добавлении к раствору трилона Б образуется стойкое комплексное соединение, розовый цвет переходит в фиолетовый.

Реактивы: 0,005 н. раствор трилона Б (готовят из стандарт-титра или из 0,1 н. раствора трилона Б): 10 мл 0,1 н. раствора трилона Б в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 200 мл. Устойчив 2 мес;

2 н. раствор натрия гидроксида. 80 г NaOH (ч. д. а., х. ч.) растворяют в 1 л дистиллированной воды;

мурексид (ч. д. а., х. ч.) свежеприготовленный раствор индикатора: 10 мг на 20 мл воды;

кальция карбонат безводный (ч. д. а., х. ч.). Стандартный 2,5 моль/л (10 мг%) раствор: 25 мг вещества растворяют в мерной колбе на 100 мл. Пригоден для исследования кальция в крови животных, кроме яйценосной птицы. При исследовании крови кур и другой яйценосной птицы необходимо подготовить 3,8 ммоль/л (15,2 мг%) раствор: 38 мг вещества растворить в мерной колбе на 100 мл.

Оборудование: стаканчики вместимостью 50 мл (лучше полистироловые); микробюретка на 2 мл с оттянутым концом; пипетки.

Ход определения. *Стандартная проба*: в стаканчик вносят 10 мл дистиллированной воды, 0,2 мл 2 н. раствора щелочи, 0,5 мл раствора кальция карбоната с содержанием 10 мг% кальция и 3 капли свежеприготовленного раствора мурексида. Раствор окрашивается в слабо-розовый цвет. Осторожно титруют раствором трилона Б до появления слабо-фиолетового цвета. Записывают результат.

Проба с сывороткой крови: в стаканчик вносят 10 мл воды, 0,2 мл раствора щелочи, 0,5 мл сыворотки крови и 3 капли раствора мурексида. Появляется слабо-розовое окрашивание. Затем титруют раствором трилона Б до появления слабо-фиолетового цвета, идентичного стандартной пробе.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{A}{Б} \cdot 2{,}5,$$

где x — количество кальция, ммоль/л; A — количество раствора трилона Б, пошедшего на титрование образца сыворотки крови, мл; $Б$ — количество раствора, пошедшего на титрования стандарта, мл; 2,5 — коэффициент для перевода в ммоль/л.

Если исчисление кальция идет в мг%, то за коэффициент берут величину 10. При исследовании сыворотки кур-несушек, когда в качестве стандарта взят раствор 3,8 ммоль/л (15,2 мг%), коэффициентами будут величины 3,8 или 15,2.

(Описанная методика апробирована на кафедре терапии и клинической диагностики Крымского государственного агротехнологического университета.)

Определение кальция в костной ткани. Предварительно проводят озоление кости. Кость освобождают от мышц, сухожилий, связок и взвешивают. У трубчатых костей отпиливают суставные концы (эпифизы). Каждый из трех частей (два эпифиза и диафиз) распиливают вдоль и поперек на 4 части. Для анализа берут примерно 1/2—1/4 часть массы диафиза и эпифиза. Масса навески зависит от размера кости, но всегда нужно брать одинаковый процент массы каждой части, предназначенной для анализа.

Отобранный материал тщательно дробят и 10—15 г помещают в предварительно прокаленный и взвешенный до постоянной массы большой тигель. Кость обугливают, для чего тигель ставят на электроплитку с асбестовой сеткой (в вытяжном шкафу) и нагревают до тех пор, пока кость не перестанет дымить. Затем тигель помещают в муфельную печь и прокаливают при темно-красном накаливании (450—500 °С) в течении 4—5 ч. Зола после сжигания должна быть светло-серого или белого цвета без примесей частиц угля. После остывания тигель переносят в эксикатор, взвешивают на тех же аналитических весах и вновь ставят в муфельную печь на 1—2 ч, затем снова взвешивают. Разница между первым и вторым взвешиваниями не должна превышать 0,0002 г. При необходимости можно рассчитать содержание сырой золы (x) по формуле

$$x = \frac{(A - B) \cdot 100}{H},$$

где A — масса тигля с золой, г; B — масса тигля, г; 100 — коэффициент для пересчета в проценты; H — навеска, г.

Содержимое тигля переносят в фарфоровую ступку, измельчают в однородную массу. На аналитических весах взвешивают 1 г зольного остатка (лучше в ранее прокаленном и взвешенном тигле). Взятую навеску в том же тигле растворяют в 10 мл 25%-ного раствора соляной кислоты при постоянном перемешивании стеклянной палочкой. Полученный раствор переносят в мерную колбу на 250 мл, тигель несколько раз обмывают дистиллированной водой, которую сливают в ту же колбу, объем ее доводят до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы хорошо перемешивают и после отстаивания проводят анализ, как описано в методике определения общего кальция в сыворотке крови.

Источник: 21.

Определение ионизированного кальция расчетным методом (по Н. Тодорову). Ионизированный кальций определяют вычислением по формуле

$$Ca^{2+} = \frac{6Ca - Б/3}{Б + 6},$$

где Ca^{2+} — ионизированный кальций, мг%; Ca — общий кальций, мг%; *Б* — общий белок, г%.

Для вычисления ионизированного кальция необходимо знать количество общего кальция и общего белка сыворотки крови.

Источник: 68.

Определение ионизированного кальция с применением обменной адсорбции (по Д. Т. Волкову). В качестве адсорбента используют нейтральный алюминия оксид, стандартизированный по Брохману, II степени активности. Ионизированный кальций устанавливают по разнице между общим кальцием и кальцием, не вступившим в ионный обмен. Последний определяют следующим образом: берут 2,5 мл плазмы (сыворотки) крови, добавляют 50 мг адсорбента из расчета 20 мг алюминия оксида на 1 мл плазмы (сыворотки) крови. Содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 5 мин при 3000 $мин^{-1}$. Надосадочный раствор осторожно сливают в пробирку, не допуская взмучивания осадка. Затем определяют содержание кальция в 0,1 мл полученного раствора по вышеописанной методике определения общего кальция. В плазме крови концентрация ионизированного кальция ниже, чем в цельной крови и сыворотке.

Источник: 12.

Примечание. В качестве антикоагулянта используют гепарин. Ca^{2+} стабилен в цельной крови при 4—8 °С в герметически закрытых шприцах в течение 2 ч. Не допускается контакт крови с воздухом.

Для измерения содержания ионизированного кальция крови и мочи используются ионоселективные анализаторы, которые производят зарубежные фирмы «Radiometer» (Дания), «Novabimedical» и «Beckman-Conlter» (США), «AVL» (Австрия).

Клиническое значение. В крови циркулирует кальций в трех формах: 45—50 % находится в ионизированном состоянии, 40—45 % связано с белками, остальное количество образует комплексы с различными моно- и бивалетными низкомолекулярными анионами. Физиологически активен ионизированный кальций.

Уровень общего кальция в крови определяется суммой ионизированного связанного с белками крови и различными анионами кальция. Определения только общего кальция для характеристики нарушений метаболизма недостаточно.

Преимущественно кальций — внеклеточный элемент. Около 99 % его находится в костной ткани в составе гидрооксиапатита, остальное количество — во внеклеточной жидкости.

Кальций — один из важнейших компонентов системы, регулирующей проницаемость мембран. Его ионы способствуют взаимодействию актина и миозина, т. е. сокращению мышечных волокон. Это осуществляется с участием магния и АТФ. В нервно-мышеч-

ных синапсах ионы кальция способствуют выделению ацетилхолина и связыванию его с холин-рецептором, а при избытке ацетилхолина активизируют холинэстеразу, расщепляющую ацетилхолин. Ион кальция активизирует процесс свертывания крови.

Всасывание, транспортировка, распределение в тканях и выделение кальция протекают с участием активных форм витамина D и паратгормона.

Уровень кальция в крови здоровых животных указан в приложениях 5 и 6. Он зависит от содержания кальция, фосфора и витамина А в рационе, состояния гормональной системы, желудочно-кишечного тракта, почек, печени и других органов.

Снижение содержания кальция в крови отмечается при длительном недостаточном поступлении его с кормом, плохом усвоении вследствие дефицита витамина D и паратгормона, которые обеспечивают его всасывание в кишечнике и препятствуют выведению с мочой. Гипокальциемия сопровождает алиментарную остеодистрофию, рахит, вторичную остеодистрофию и многие другие болезни. Уровень кальция в крови стабильно удерживается длительное время за счет мобилизации его из костной ткани. Компенсаторные механизмы проявляются при развитии алиментарной остеодистрофии и рахита, при которых низкое количество кальция в крови обнаруживают при затяжном, тяжелом течении патологического процесса.

Снижение уровня кальция в крови при вторичной остеодистрофии связано, вероятно, с гипофункцией околощитовидных желез и недостаточным синтезом паратгормона.

Резко выраженную гипокальциемию наблюдают при послеродовом парезе. Объясняется такое явление, очевидно, гиперсекрецией кальцитонина, вырабатываемого С-клетками щитовидной железы, который в противоположность паратгормону способствует минерализации кости и понижает уровень кальция в крови.

Причиной гипокальциемии может быть гипофункция околощитовидных желез. Так как кальций участвует в нервно-мышечном возбуждении, то при его резком снижении появляются тонические, клонические судороги и парезы.

Гипокальциемия возможна при гломерулонефрите, интерстициальном нефрите, когда наступает гипопротеинемия, а следовательно, потеря связанного с белком кальция; при остром панкреатите из-за избытка глюкогона; опухоли щитовидной железы в связи с избыточной продукцией кальцитонина.

Повышение содержания кальция в крови может быть при передозировке витамина D, гиперфункции паращитовидных желез, длительном применении антоцидов при язвенной болезни.

Определение неорганического фосфора в сыворотке крови с ванадат-молибденовым реактивом (по Пулсу в модификации В. Ф. Коромыслова и Л. А. Кудрявцевой). Принцип. Фосфор в безбелковом фильтрате дает лимонно-желтое окрашивание с вана-

дат-молибденовым реактивом. Степень окраски измеряют на фотоэлектроколориметре.

Р е а к т и в ы: 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

реактив на фосфор. Готовят его смешиванием 500 мл 0,234%-ного раствора аммония ванадата, 1000 мл 2,5 н. (2,5 моль/л) раствора соляной кислоты и 1000 мл 3,53%-ного раствора молибденовокислого аммония. 0,234%-ный раствор аммония ванадата готовят путем растворения 2,34 г вещества в 500 мл горячей дистиллированной воды, добавляют 28,0 мл концентрированной соляной кислоты плотностью 1,19, охлаждают до 20 °С и доводят до 1 л дистиллированной водой. Для получения 3,53%-ного раствора молибденовокислого аммония 35,3 г соли растворяют в 700 мл дистиллированной воды, затем все количество переносят в мерную колбу на 1 л и дистиллированной водой доводят до метки. 2,5 моль/л раствор соляной кислоты готовят путем доведения 207,5 мл концентрированной соляной кислоты до 1 л дистиллированной водой. Реактив на фосфор хранят в склянке из темного стекла не более 2 мес;

основной стандартный раствор фосфора. 4,394 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4 х. ч., ч. д. а.), высушенного до постоянной массы в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, растворяют в 1 л дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 1 мг фосфора;

5 мг%-ный рабочий стандартный раствор фосфора. 5 мл основного стандартного раствора фосфора доводят в мерной колбе на 100 мл дистиллированной водой до метки.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; колбы конические термостойкие на 1 л; колбы мерные на 50, 100, 500, 1000 мл; электроплитка; пипетки; пробирки; центрифуга.

Х о д о п р е д е л е н и я. В центрифужную пробирку вносят 2,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сыворотки, 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и через 10 мин центрифугируют 15 мин при 3000 $мин^{-1}$. С помощью шприца и пипетки, не затрагивая осадка, берут 2,5 мл центрифугата, добавляют 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кювете с толщиной слоя 1 см против дистиллированной воды. Параллельно готовят стандартную пробу: к 0,5 мл рабочего стандарта 5 мг%-ного раствора фосфора добавляют 2,5 мл дистиллированной воды и 2 мл раствора трихлоруксусной кислоты, смешивают. Затем берут 2,5 мл этого раствора, вносят в пробирку, добавляют 2,5 мл реактива на фосфор и через 10 мин колориметрируют в том же режиме, что и пробу сыворотки.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = (A/Б) \cdot 5,$$

где x — количество фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки, мг; A — экстинкция испытуемого образца; $Б$ — экстинкция стандартного раствора; 5 — коэффициент для перевода в мг%.

Для выражения содержания фосфора в ммоль/л в качестве коэффициента берут 1,615 или величину в мг% умножают на 0,323 (приложение 4).

Примечание. Сыворотка должна быть отделена от эритроцитов не позже чем через 1 ч после взятия крови. Она должна быть свободна от гемолиза, липемии, желтушности. Допустимо хранение сыворотки или плазмы в течение 1 сут при комнатной температуре, 4 сут при — 4—8 °С.

Клиническое значение. Фосфор — один из основных структурных элементов организма. Все виды обмена в организме неразрывно связаны с превращением фосфорной кислоты. Фосфор входит в структуру нуклеиновых кислот, благодаря фосфорилированию осуществляется кишечная адсорбция, гликолиз, прямое окисление углеводов, транспорт липидов, обмен аминокислот и т. д. Макроэргические фосфорные соединения, среди которых центральное место занимает АТФ, — универсальные донаторы и аккумуляторы энергии. 80—85 % фосфора содержится в скелете. В крови он присутствует в неорганической и в органической формах. Органический фосфор связан с белками и липидами. Всего в крови животного и человека содержится около 10 фракций фосфорных соединений.

В клинической практике диагностическое значение имеет неорганический фосфор. Нормативы содержания его в сыворотке (плазме) крови здоровых животных приведены в приложениях 5 и 6.

Снижение уровня фосфора в крови отмечается при длительном недостатке его в рационе, плохом усвоении, при расстройствах желудочно-кишечного тракта или дефиците витамина D, при гиперфункции паращитовидных желез и гипофункции щитовидной железы, когда увеличивается секреция паратгормона и уменьшается выработка кальцитонина. Отмечается оно и при алиментарной остеодистрофии, рахите, уровской болезни, пеллагре, длительном лечении инсулином, кальция хлоридом, болезнях желудочно-кишечного тракта.

Повышение уровня фосфора в крови может быть вызвано уменьшением секреции паратгормона, когда тормозится реабсорбция фосфора в почках. Увеличение кальцитонина стимулирует реабсорбцию фосфора в почках и приводит к гиперфосфатемии.

Гиперфосфатемия встречается при сердечной недостаточности, кетозе, приеме больших доз витамина D, нефрите, нефрозе, токсикозах беременности, мышечном перенапряжении. У телят молочного периода содержание фосфора в крови несколько выше, чем у взрослых животных. Содержание фосфора в безбелковом фильтрате цельной крови, плазмы и сыворотки, обработанных одновременно, одинаково.

Определение неорганического фосфора в сыворотке крови животных с аскорбиновой кислотой. Принцип. В безбелковом

центрифугате неорганический фосфор реагирует с молибденовой кислотой с образованием фосфорно-молибденовой кислоты, которая восстанавливается аскорбиновой кислотой до синего фосфорно-молибденового комплекса. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации неорганического фосфора.

Реактивы: хлорная кислота — 20 мл;

50%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ) — 100 мл (флакон № 1);

5%-ный раствор молибдената аммония — 100 мл (флакон № 2);

аскорбиновая кислота — 1 г (флакон № 3);

основной стандартный раствор фосфора — 100 мг% (ампула);

1 н. соляная кислота — 10 мл.

Подготовка рабочих растворов. 10%-ный раствор ТХУ: содержимое флакона № 1 переносят в колбу на 500 мл и доводят объем дистиллированной водой до метки. Можно приготовить 100 мл: 20 мл 50%-ного раствора ТХУ в колбе на 100 мл довести дистиллированной водой до метки. В случае появления мутности раствор фильтруется.

5%-ный раствор молибдената аммония (флакон № 2) готов к применению.

0,1 н. раствор соляной кислоты: содержимое флакона (10 мл) 1 н. соляной кислоты переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Раствор аскорбиновой кислоты: содержимое флакона № 3 растворяют в 100 мл 0,1 н. раствора соляной кислоты. Раствор готовят перед использованием.

Рабочий калибровочный (стандартный) раствор фосфора: в мерную колбу на 100 мл вносят 5 мл (ампула) основного калибровочного раствора фосфора и доводят объем дистиллированной водой до метки. Получают 5 мг%-ный (50 мг/л) раствор фосфора.

Ход определения. *Опытная проба.* В центрифужную пробирку вносят 2,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл сыворотки крови и 3 мл 10%-ного раствора ТХУ. Перемешивают стеклянной палочкой. Через 10 мин центрифугируют 20 мин при 3000 мин$^{-1}$. Осторожно с помощью шприца отбирают 3 мл центрифугата, добавляют 0,6 мл раствора молибдената аммония, 0,12 мл раствора аскорбиновой кислоты и 1,3 мл дистиллированной воды. Перемешивают и через 20 мин колориметрируют в кювете с толщиной слоя 1 см при красном светофильтре (630—690 нм) против контроля.

Контроль. К 3 мл 10%-ного раствора ТХУ добавляют 0,6 мл раствора молибдената аммония, 0,12 мл раствора аскорбиновой кислоты, 1,3 мл дистиллированной воды.

Калибровочный раствор. Перемешивают 2,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл 5 мг%-ного раствора фосфора, 3 мл 10%-ного раствора ТХУ. Через 30 мин 3 мл этой смеси переносят в другую пробирку, добавляют 0,6 мл раствора молибдената аммония, 0,12 мл раствора ас-

аскорбиновой кислоты, 1,3 мл дистиллированной воды. Через 20 мин колориметрируют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 5,$$

где x — количество неорганического фосфора, мг/100 мл; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция 5 мг/100 мл раствора фосфора; 5 — коэффициент для перевода в мг/100 мл (мг%).

При переводе мг% в ммоль полученную величину умножают на 0,323.

Источник: 27.

Определение магния в сыворотке (плазме) крови по цветной реакции с титановым желтым (по Кункелю, Пирсону, Швейгерту в модификации И. В. Петрухина). П р и н ц и п. Магний реагирует с титановым желтым в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации магния.

Р е а к т и в ы: 20 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);

0,01%-ный раствор титанового желтого. Готовят в день определения;

0,02%-ный раствор поливинилового спирта;

основной стандартный раствор магния. Растворяют 8,458 г магния хлорида ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$) в дистиллированной воде и доводят до 1 л в мерной колбе: 1 мл раствора содержит 1 мг магния (100 мг%). Можно готовить 0,01 н. раствор магния сульфата из стандарт-титра (фиксанала), который содержит 12,15% магния;

рабочий стандартный раствор с содержанием 2 мг% магния. Берут 1 мл основного раствора магния хлорида с содержанием 100 мг% и доводят в мерной колбе дистиллированной водой до 50 мл. При использовании в качестве основного раствора 0,01 н. раствора магния сульфата его разводят 1 : 6 (1 мл раствора с содержанием 12,15 мг% магния + 5 мл дистиллированной воды) и получают раствор с содержанием 2,02 мг% магния;

2 н. (2 моль/л) раствор натрия гидроксида. 80 г натрия гидроксида растворяют в мерной колбе и доводят дистиллированной водой до 1 л.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; центрифуга; пробирки центрифужные.

Х о д о п р е д е л е н и я. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы), 1 мл раствора ТХУ, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и через 10 мин центрифугируют при 5000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин или при 3000 $мин^{-1}$ в течение 20 мин. Надосадочная жидкость должна быть прозрачной. С помощью шприца и пипетки, не затрагивая осадка, берут 0,5 мл прозрачного центрифугата, добавляют 1 мл раствора титанового желтого, 1 мл раствора поливинилового спирта и 2 мл натрия гидроксида, перемешивают.

Таким же образом готовят стандартную пробу. В пробирку вносят 1 мл стандартного рабочего раствора магния (2 мг%), 1 мл ТХУ, перемешивают. К 0,5 мл этой смеси добавляют 1 мл раствора титанового желтого, 1 мл раствора поливинилового спирта и 2 мл раствора натрия гидроксида, смешивают.

Параллельно готовят контроль на реактивы. В пробирку вносят 1 мл дистиллированной воды, 1 мл раствора ТХУ, 1 мл раствора титанового желтого, 2 мл раствора поливинилового спирта и 2 мл раствора натрия гидроксида, перемешивают. Через 10 мин опытную и стандартную пробы колориметрируют в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) против контроля на реактивы.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{A}{Б} \cdot 2,$$

где x — количество магния, мг%; A — экстинкция опытной пробы; $Б$ — экстинкция стандартного рабочего раствора магния; 2 — коэффициент для пересчета в мг%.

При использовании стандартного раствора с содержанием 2,02 мг% магния в качестве коэффициента используют эту величину. При расчете содержания магния в ммоль/л в качестве коэффициента берут 0,822 при содержании в стандартном растворе 2 мг% магния или 0,830 при содержании в стандартном растворе 2,02 мг% магния. При переводе мг% в ммоль/л полученную величину умножают на 0,411 (см. приложение 4).

Источники: 29, 76.

Примечание. Самым точным и чувствительным методом определения общего кальция и общего магния в биологических жидкостях считается атомная абсорбционная спектрофотометрия.

Клиническое значение. Циркулирующий в крови магний существует в трех формах: около 55 % находится в ионизированной биологически активной форме; от 12 до 15 % образует комплексы с низкомолекулярными анионами; от 30 до 33 % связано с белками крови. Около 25 % магния взаимодействует с альбуминами и около 8 % — с глобулинами. Концентрация магния в клетках в 10—15 раз выше, чем во внеклеточной жидкости. Метаболическая роль магния определяется его участием как кофактора более чем в 300 экзиматических реакциях. Магний практически участвует во всех обменных процессах организма. Ионы магния активируют АТФ-фазу, обеспечивают работу K—Na-насоса клеточных мембран. Магний и кальций в различных тканях могут действовать и как синергисты, и как антагонисты. В гладких мышцах сосудов миокарда отмечают их антагонизм. В то же время дефицит как магния, так и кальция повышает нервно-мышечную возбудимость. Магний усиливает расщепление ацетилхолина путем активации холинэстеразы.

При *снижении уровня магния* в крови увеличивается концентрация ацетилхолина, достигая предельной величины, при которой

блокируется передача нервного возбуждения, наступают тетания и судороги. Магний тесно связан с обменом кальция, фосфора и калия. Более 50 % его находится в костях и зубах.

Гипомагниемию отмечают при диарее, полиурической стадии острой почечной недостаточности вследствие потери магния с калом или мочой, при циррозе печени, гиперпаратиреозе, гипотиреозе, хроническом панкреатите, усиленной лактации.

Снижение содержания магния в крови бывает при пастбищной тетании, алиментарной остеодистрофии, послеродовом парезе, транспортной болезни у коров. Гипомагниемия наступает вследствие поступления в организм избытка калия (с молодой травой) или азота с концентрированными кормами, а также азотсодержащими небелковыми средствами.

3.3.4. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния белкового обмена, а также функций отдельных органов проводят определение в сыворотке крови общего белка и его фракций, мочевины, креатинина и других составляющих остаточного азота.

Для определения общего белка сыворотки крови используют методы сжигания (къельдалеметрические), рефрактометрические, спектрофотометрические и др. В лабораториях ветеринарной медицины преимущественно пользуются рефрактометрическим и колориметрическим (биуретовым) методами. При определении белковых фракций сыворотки крови используют электрофоретические (на агаровом геле, в полиакриламидном геле, на бумаге, ацетате целлюлозы), турбидиметрические (высаливание нейтральными солями), седиментационные (разделение белков на фракции ультрацентрифугированием) методы и др.

В клинической практике для разделения белков пользуются чаще электрофоретическими и турбидиметрическими методами. При электрофорезе на бумаге получают 5 основных фракций: альбумины, α_1-, α_2, β- и γ-глобулины. Недостатки этого метода — длительность проведения анализа (результаты исследования можно получить только на 2—3-й день), не совсем четкое разделение фракций белков. Электрофорезом на агаровом геле получают более четкое разделение белковых фракций, чем на бумаге, однако сложность процедуры приготовления геля не позволяет широко внедрять этот метод в лабораторную практику. С помощью электрофореза на полиакриламидном геле можно получать около 30 фракций белка. Недостаток метода — трудность количественной оценки полученных фракций.

Унифицированным признан метод электрофореза на ацетате целлюлозы. При отсутствии в лаборатории аппарата для электрофореза используются методы осаждения белков нейтральными солями с последующим турбидиметрическим измерением степени помутнения среды на ФЭКе. Соотношение альбуминов и глобули-

нов в сыворотке крови определяют белково-осадочными пробами (сулемовой, с цинк-сульфатом, тимоловой и др.).

Под остаточным азотом понимают количество его, которое остается в крови после осаждения белков. Сюда входит азот мочевины, аминокислот, креатинина, креатина, мочевой кислоты, индикана, аммиака, полипептидов, нуклеотидов, биогенных аминов и других продуктов белкового обмена. Основная часть остаточного азота крови — азот мочевины, на долю которого приходится не менее 1/2 всего небелкового азота крови.

Около 1/4 остаточного азота составляет азот аминокислот, креатина и креатинина. Наибольшее клиническое значение имеет определение отдельных фракций остаточного азота, в частности мочевины, аминного азота, креатина и креатинина, мочевой кислоты, индикана.

Для определения мочевины в крови, моче и других биологических жидкостях применяют диацетилмонооксимные, уреазные, гипохлоритные, гипобромидные, ксантгидроловые и другие методы. Наиболее распространенным является колориметрический метод, основанный на взаимодействии мочевины с диацетилмонооксимом с образованием окрашенных продуктов (реакция Фирона). Однако более точными и специфическими являются методы определения мочевины с использованием фермента уреазы.

Для определения белка, альбумина, мочевины, креатинина, а также других биохимических показателей возможно применение отражательных фотометров и диагностических полосок системы «сухой химии», биохимических автоанализаторов. Пробирки для взятия крови не должны содержать детергенты и другие моющие средства. Хранят их закрытыми.

Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом. П р и н ц и п. В основу рефрактометрических методов анализа положено определение показателя (коэффициента) преломления исследуемого вещества — отношения синуса угла падения луча света к синусу угла его преломления. В сыворотке крови величина рефракции в первую очередь зависит от количества белков.

Р е а к т и в: смесь этилового спирта с эфиром 1 : 1.

О б о р у д о в а н и е: рефрактометры ИРФ-4546, УРЛ, RL и др.

Х о д о п р е д е л е н и я. Устанавливают прибор на нуль по дистиллированной воде при температуре 20 °С. Предварительно верхнюю и нижнюю камеры протирают марлевой салфеткой, смоченной смесью спирта с эфиром, и насухо — ватным тампоном. Поверхность призм при установке прибора на нуль и исследовании образца сыворотки крови должна быть чистой и сухой, от этого во многом зависит результат анализа.

Окуляр шкалы коэффициентов преломления ставят в крайнее положение на себя. Опускают нижнюю половину камеры, на призму наносят 1—2 капли дистиллированной воды. Камеру закрыва-

ют, окуляр шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением винта лимба дисперсии.

Линию окуляра шкалы устанавливают на цифру 1,3330 (показатель преломления воды) и в зрительную трубу наблюдают границу светотени по отношению к точке пересечения двух взаимно перпендикулярных линий. Если граница светотени проходит через точку пересечения линий, то прибор установлен на нуль. Если это не так, то при помощи ключа и маленького винта на корпусе зрительной трубы ставят границы светотени на точку пересечения линий. Поверхность призм досуха вытирают мягкой марлевой салфеткой и ватным тампоном.

Приступают к исследованию образцов крови. Автоматической или обычной пипеткой наносят на нижнюю призму 0,1 мл (2 капли) сыворотки крови и плотно закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают винт до тех пор, пока граница светотени не достигнет пересечения двух визирных линий. Через окуляр по шкале отсчета показателя преломления дважды отсчитывают показатель преломления. Вычисляют среднее показание. Марлевой салфеткой удаляют с поверхности призм сыворотку, протирают поочередно ватными тампонами, сухим и смоченным спиртово-эфирной смесью до чистого сухого состояния. В случае использования стеклянной палочки ее после каждого образца сыворотки крови промывают и высушивают марлей. Исследуют следующую пробу.

Р а с ч е т. Содержание белка (г/л) определяют по таблице 10 с учетом величины показателя преломления рефрактометра. Если температура в камере во время исследования не соответствует 20 °С, то вводят поправку 0,0001 на каждый градус: в случае низкой температуры поправку вычитают, при более высокой — прибавляют.

10. Вычисление общего белка в сыворотке крови по показателю преломления

Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л
1,3431	41,6	1,3492	76,8	1,3532	99,9
1,3435	43,8	1,3493	77,3	1,3533	100,5
1,3439	46,0	1,3494	77,9	1,3534	101,0
1,3443	48,1	1,3495	78,3	1,3535	101,7
1,3446	50,3	1,3496	79,1	1,3536	102,3
1,3450	52,5	1,3497	79,6	1,3537	102,8
1,3454	54,7	1,3498	80,2	1,3538	103,3
1,3458	56,8	1,3499	80,8	1,3539	103,9
1,3460	59,2	1,3500	81,4	1,3540	104,4
1,3461	59,7	1,3501	82,0	1,3541	104,9
1,3462	60,2	1,3502	82,6	1,3542	105,4

Продолжение

Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л	Показатель преломления	Белок, г/л
1,3463	60,7	1,3503	83,3	1,3543	106,0
1,3464	61,2	1,3504	83,8	1,3544	106,4
1,3465	61,8	1,3505	84,4	1,3545	107,8
1,3466	62,3	1,3506	84,9	1,3546	107,5
1,3467	62,9	1,3507	85,5	1,3547	108,0
1,3468	63,4	1,3508	86,1	1,3548	108,6
1,3469	64,0	1,3509	86,7	1,3549	109,2
1,3470	64,5	1,3510	87,3	1,3550	109,8
1,3471	65,0	1,3511	88,0	1,3551	110,4
1,3472	65,5	1,3512	88,6	1,3552	110,9
1,3473	66,0	1,3513	89,2	1,3553	111,5
1,3474	66,5	1,3514	89,7	1,3554	112,1
1,3475	67,1	1,3515	90,3	1,3555	112,6
1,3476	67,7	1,3516	90,8	1,3556	113,2
1,3477	68,2	1,3517	91,4	1,3557	113,7
1,3478	68,8	1,3518	92,0	1,3558	114,2
1,3479	69,3	1,3519	92,6	1,3559	114,7
1,3480	70,4	1,3520	93,2	1,3560	115,2
1,3481	71,0	1,3521	94,0	1,3561	115,7
1,3482	71,5	1,3522	94,6	1,3562	116,2
1,3483	72,0	1,3523	95,1	1,3563	116,7
1,3484	72,5	1,3524	95,7	1,3564	117,1
1,3485	73,1	1,3525	96,3	1,3565	117,7
1,3486	73,6	1,3526	96,8	1,3566	118,2
1,3487	74,2	1,3527	97,3	1,3567	118,7
1,3488	74,8	1,3528	97,8	1,3568	119,3
1,3489	75,4	1,3529	98,4	1,3569	119,8
1,3490	75,9	1,3530	98,9	1,3570	120,4
1,3491	76,3	1,3531	99,4	1,3571	121,0

Примечание. Рефрактометрический метод дает ошибку в случаях использования сыворотки со следами гемолиза, содержащего много липидов, билирубина, а также сахара и мочевины. Недостаточное промывание линз между анализами приводит к контаминации последних и завышению результатов.

Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции. Принцип. Белки реагируют в щелочной среде с меди сульфатом, образуя соединения, окрашенные в фиолетовый цвет.

Реактивы: 0,9%-ный раствор натрия хлорида (ч. д. а., х. ч.); 0,2 моль/л раствор натрия гидроксида (ч. д. а., х. ч.), свободного от углекислого газа (кипяченая дистиллированная вода);

0,5%-ный раствор калия йодида (ч. д. а., х. ч.) в 0,2 моль/л растворе натрия гидроксида. 0,5 г йодида калия помещают в мерную колбу на 100 мл, доводят 0,2 моль/л раствором натрия гидроксида до метки. Реактив стабилен в течение 2 нед при хранении в посуде из темного стекла;

калий-натрий виннокислый 4-водный (сегнетова соль) (ч. д. а.);

меди сульфат 5-водный (ч. д. а., х. ч.);

биуретовый реактив основной. 4,5 г калия-натрия виннокислого 4-водного ($KNaC_6H_4O_6 \cdot 4H_2O$) растворяют в мерной колбе на 100 мл в 40 мл 0,2 моль/л раствора натрия гидроксида. После растворения прибавляют 1,5 г меди сульфата ($CuSO_4$) и 0,5 г калия йодида (KI). Перемешивают до полного растворения и доводят до 100 мл 0,2 моль/л раствором натрия гидроксида. Хранят в посуде из темного стекла. Реактив стоек;

рабочий раствор биуретового реактива. Смешивают одну часть основного биуретового раствора с четырьмя частями 0,5%-ного раствора калия йодида. Хранят в холодильнике в темной посуде не более 2 нед;

калибровочный раствор альбумина основной. В пробирку вносят 1 г кристаллического сывороточного (из человеческой или бычьей сыворотки) альбумина и 9 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида. Тщательно перемешивают. 1 мл раствора содержит 0,1 г белка. Хранят в холодильнике. Сывороточный альбумин должен отвечать требованиям стандарта.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; колбы мерные.

Х о д о п р е д е л е н и я. К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5 мл рабочего раствора биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены. Через 30 мин (но не позже чем через 1 ч) измеряют оптическую плотность на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 540—560 нм (зеленый светофильтр) против контроля (5 мл рабочего раствора биуретового реактива и 0,1 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида).

Р а с ч е т ведут по калибровочному графику. При построении калибровочного графика готовят рабочие калибровочные растворы из основного стандартного раствора 10%-ного белка (табл. 11).

11. Приготовление рабочих калибровочных растворов белка

№ пробирки	Основной стандартный раствор альбумина, мл	0,9%-ный раствор натрия хлорида, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,2	0,8	20
2	0,4	0,6	40
3	0,6	0,4	60
4	0,8	0,2	80
5	1,0	—	100

Из каждого из четырех разведений альбумина и одной неразведенной пробы берут по 0,1 мл и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива. Через 30 мин измеряют экстинкцию на ФЭКе, как в опыте против холостой пробы.

Измерения оптической плотности стандартных растворов начинают с растворов наименьшей концентрации. По полученным данным из пяти определений строят калибровочную кривую, которую периодически проверяют.

Примечания: 1. При содержании белка в сыворотке крови больше 10 % сыворотку разводят физиологическим раствором 1 : 1, результат умножают на 2. 2. Рефрактометрический и биуретовый методы по точности сравнимы между собой. Биуретовый метод хорошо воспроизводимый, однако необходимо использовать реактивы ч. д. а. или х. ч. Строго соблюдать правила их приготовления и хранения, предъявлять строгие требования к наборам реактивов заводского изготовления, использовать кипяченую дистиллированную воду.

Источники: 43, 67.

Клиническое значение. Белки крови выполняют многие функции: поддерживают постоянство онкотического давления, pH крови, уровень катионов крови, играют важную роль в образовании иммунитета, комплексов с углеводами, липидами, гормонами и другими веществами.

Альбумины и фибриноген крови образуются в печеночных клетках, глобулины — в клетках ретикуло-эндотелиальной системы костного мозга и ретикулоэндотелиальных (купферовых или звездчатых) клетках печени. Поэтому содержание сывороточных белков во многом зависит от состояния печени. При болезнях печени снижается синтез альбуминов и фибриногена, увеличивается образование глобулинов (за исключением цирроза), наступает диспротеинемия, нарушаются процессы обновления белков.

Нормативы содержания общего белка сыворотки крови приведены в приложениях 5—7.

Снижение количества общего белка в сыворотке крови (гипопротеинемия) отмечается при длительном недокорме животных, алиментарной остеодистрофии, уровской болезни, гипокобальтозе, эндемическом зобе, хронических расстройствах желудочно-кишечного тракта, нефрите, нефрозе, циррозе печени, туберкулезе и других заболеваниях, при которых снижаются аппетит и усвоение питательных веществ корма.

Повышение уровня общего белка в сыворотке крови (гиперпротеинемия) в условиях интенсивного животноводства встречается значительно чаще, чем гипопротеинемия. Оно бывает при белковом перекорме, кетозе, вторичной остеодистрофии, токсикозах и других болезнях, сопровождающихся дистрофией или воспалением

печени. Повышение содержания общего белка в сыворотке крови в этих случаях идет за счет глобулиновых фракций при одновременном уменьшении концентрации альбуминов.

Гиперпротеинемия бывает при тяжелых формах диареи, дегидратации организма, острых воспалительных процессах, флегмоне, сепсисе, пневмонии, бронхопневмонии и др.

Примечание. Концентрация общего белка в плазме крови на 3—5 г/л больше, чем в сыворотке, вследствие присутствия в ней фибриногена. После кормления содержание белка повышается.

Определение белковых фракций в сыворотке крови. Для определения белковых фракций в сыворотке крови используют методы фотометрии, высаливания нейтральными солями, электрофоретического фракционирования, иммунологические и др.

Из электрофоретических методов предпочтение отдается электрофорезу на пленках из ацетата целлюлозы и электрофорезу на бумаге. Однако для выполнения этих методов требуются дефицитные реактивы и специальные приспособления и приборы, поэтому широкого применения в ветеринарии они не находят. Наиболее простые методы приведены ниже.

Определение альбумина в сыворотке крови по реакции с бромкрезоловым зеленым. Принцип. При взаимодействии альбумина с бромкрезоловым зеленым в слабокислой среде в присутствии детергента образуется окрашенный комплекс синего цвета.

Реактивы: уксусная кислота, 1 моль/л. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 60 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем до метки;

натрия гидроксид (ч. д. а., х. ч.), 1 моль/л;

полиоксиэтиленлауриловый эфир (бридж 35);

ацетатный буфер, 0,05 моль/л, pH 4,2 с добавлением детергента. 0,05 г бриджа 35 растворяют в 200 мл воды, добавляют 50 мл 1 моль/л раствора уксусной кислоты, 13,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и доводят объем водой до 1 л. Перемешивают, проверяют pH. Реактив стабилен при хранении в холодильнике;

бромкрезоловый зеленый (БКЗ) водорастворимый индикатор (ч. д. а.), 1,2 ммоль/л. 0,4292 БКЗ растворяют в 200 мл воды в мерной колбе вместимостью 500 мл и доводят объем до метки. Стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла;

рабочий раствор БКЗ в ацетатном буфере. В мерную колбу вместимостью 1 л вносят 85 мл 1,2 ммоль/л раствора БКЗ, доводят объем до метки ацетатным буфером с детергентом. Стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла;

основной калибровочный раствор альбумина, 10 г на 100 мл. Можно использовать ампулированный 10%-ный раствор альбумина плацентарного.

Оборудование: фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр.

Ход определения. 10 мкл сыворотки крови (или 0,1 мл сыворотки, разведенной в 10 раз 0,9%-ным раствором NaCl) тщательно перемешивают, избегая образования пены, с 4 мл рабочего раствора БКЗ в ацетатном буфере. Через 5—10 мин измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против холостой пробы на реактивы или на спектрофотометре при длине волны 625 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Окраска стабильна в течение 8 ч.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо сыворотки добавляют 0,1 мл воды.

Расчет ведут по калибровочной кривой. Построение калибровочной кривой: готовят ряд разведений основного калибровочного раствора, как указано в таблице 12. Калибровочные растворы обрабатывают так же, как и опытные, но вместо сыворотки добавляют 10 мкл калибровочного раствора. Калибровочная кривая линейна до концентрации альбумина 60 г/л.

12. Приготовление разведений основного калибровочного раствора

№ пробирки	Основной калибровочный раствор альбумина, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание альбумина в сыворотке, г/л
1	1,0	4,0	20
2	1,5	3,5	30
4	2,0	3,0	40
5	2,5	2,5	50
6	3,0	2,0	60

Источники: 43, 45.

Определение иммуноглобулинов в сыворотке крови по реакции с натрия сульфитом. Принцип. При взаимодействии иммунных глобулинов сыворотки крови с раствором натрия сульфита изменяется структура белковых молекул и раствор мутнеет с интенсивностью, пропорциональной концентрации иммуноглобулинов.

Реактив: 18%-ный раствор натрия сульфита (Na_2SO_3, ч. д. а., х. ч.). 18 г вещества растворяют в 82 мл дистиллированной прокипяченной воды.

Оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход определения. В две пробирки вносят по 3,8 мл 18%-ного раствора натрия сульфита и добавляют по 0,1 мл сыворотки крови, смешивают и через 20 мин колориметрируют на ФЭК-56М при синем светофильтре (540 нм) или на КФК-2, КФК-3 при длине волны 400 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм против 18%-ного раствора натрия сульфита.

Если оптическая плотность (экстинкция) подготовленного образца сыворотки крови выше 1,3—1,5, сыворотку разводят изотоническим раствором натрия хлорида 1 : 1 и повторяют измерение. Полученные результаты параллельных определений складывают и усредняют.

Расчет ведут по калибровочной кривой, построенной с использованием сыворотки крови с известным содержанием иммуно-

13. Содержание иммуноглобулинов (IG) в сыворотке крови в зависимости от оптической плотности

Оптическая плотность	Содержание IG, мг/мл	Оптическая плотность	Содержание IG, мг/мл
0,1	2,28	0,45	10,00
0,11	2,60	0,50	11,4
0,12	2,92	0,55	12,4
0,125	3,03	0,60	13,6
0,13	3,14	0,65	14,6
0,135	3,37	0,70	15,8
0,14	3,60	0,75	16,8
0,145	3,70	0,80	17,8
0,15	3,80	0,85	19,0
0,155	3,93	0,90	20,2
0,16	4,06	0,95	21,2
0,165	4,17	1,00	22,3
0,17	4,28	1,05	23,4
0,175	4,39	1,1	24,6
0,18	4,50	1,15	25,8
0,185	4,61	1,2	26,8
0,19	4,72	1,25	28,0
0,195	4,83	1,30	29,0
0,20	4,94	1,35	30,1
0,25	5,80	1,40	31,2
0,30	6,80	1,45	32,3
0,35	8,00	1,50	33,4
0,40	9,00		

глобулинов. Для этой цели можно пользоваться таблицей Н. А. Костыпы (табл. 13).

Примечание. Метод приемлем в основном для определения иммунных глобулинов у новорожденных животных.

Источник: 20.

Определение иммунных белков в сыворотке крови по реакции с цинка сульфатом (цинк-сульфатный тест — ЦСТ). Принцип. При внесении в раствор, содержащий иммунные белки, цинка сульфаты изменяется белковая молекула и раствор мутнеет. Степень помутнения раствора прямо пропорциональна содержанию иммуноглобулинов и может быть измерена фотометрическими приборами.

Реактивы: 20,8 мг/100 мл раствор сульфата цинка (х. ч.). Готовят в день исследований на прокипяченной дистиллированной воде (для удаления углекислого газа). Длительному хранению не подлежит;

барий сульфатный — стандарт мутности: 3 мл 1,15%-ного раствора бария хлорида (х. ч.) на дистиллированной воде вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки 0,2%-ным раствором серной кислоты. Полученный раствор соответствует 20 ед. ЦСТ по степени мутности. Для приготовления стандарта 40 ед. мутности в мерную колбу на 100 мл вносят 6 мл 1,15%-ного раствора бария хлорида, а для стандарта с 10 ед. мутности — 1,5 мл. Далее растворяют, как в предыдущем случае. По полученным трем стандартным растворам мутности (10, 20, 40 ед.) строят калибровочную кривую для данного прибора (ФЭК).

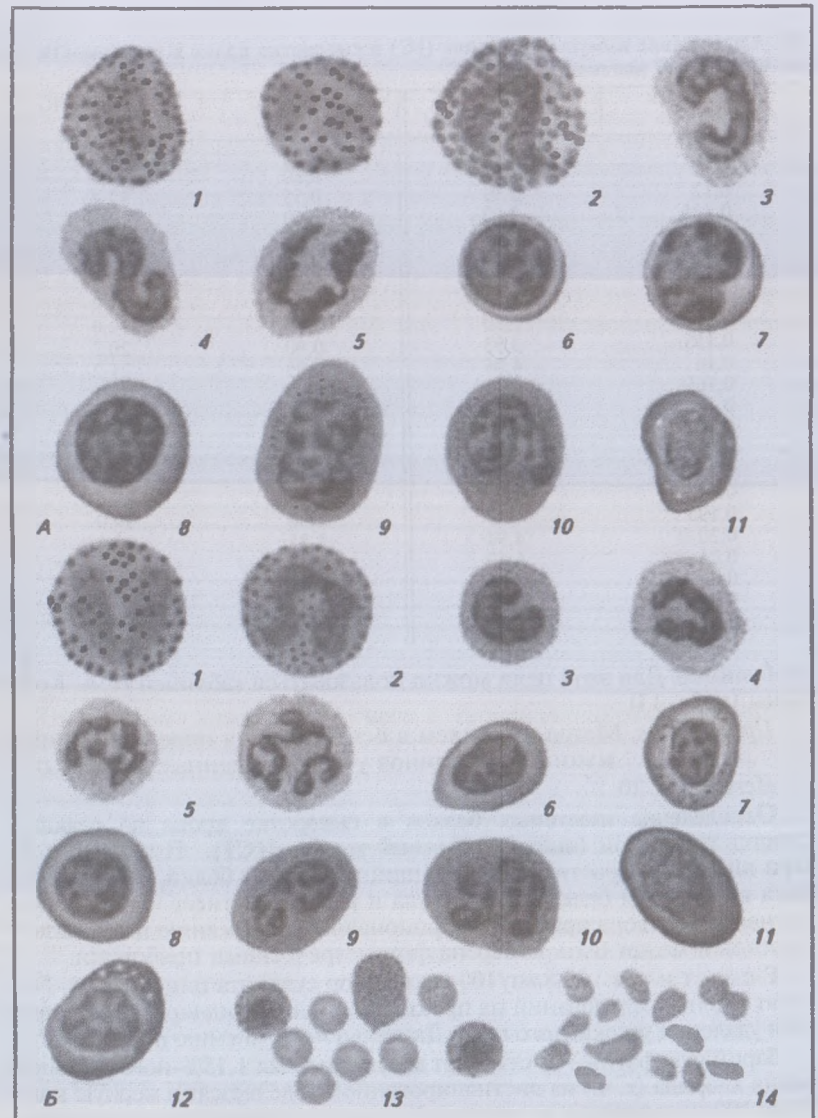


Рис. 1. Форменные элементы крови (норма):

А — крупного рогатого скота; *Б* — овцы; *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — юные нейтрофилы; *4* — палочкоядерные нейтрофилы; *5* — сегментоядерные нейтрофилы; *6*, *7* и *8* — малый, средний и большой лимфоциты; *9* и *10* — моноциты; *11* и *12* — клетки Тюрка; *13* — эритроциты и ретикулоциты; *14* — тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву)

Вкл. Зак. № 4196

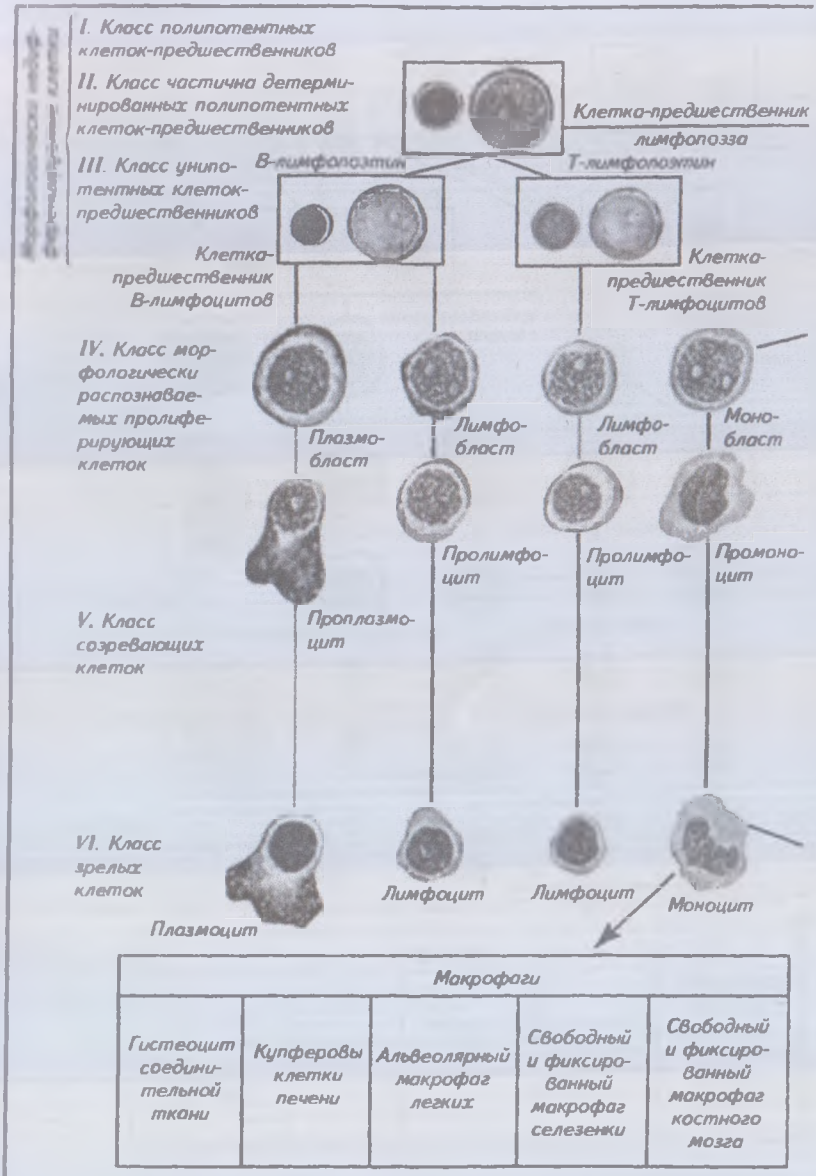
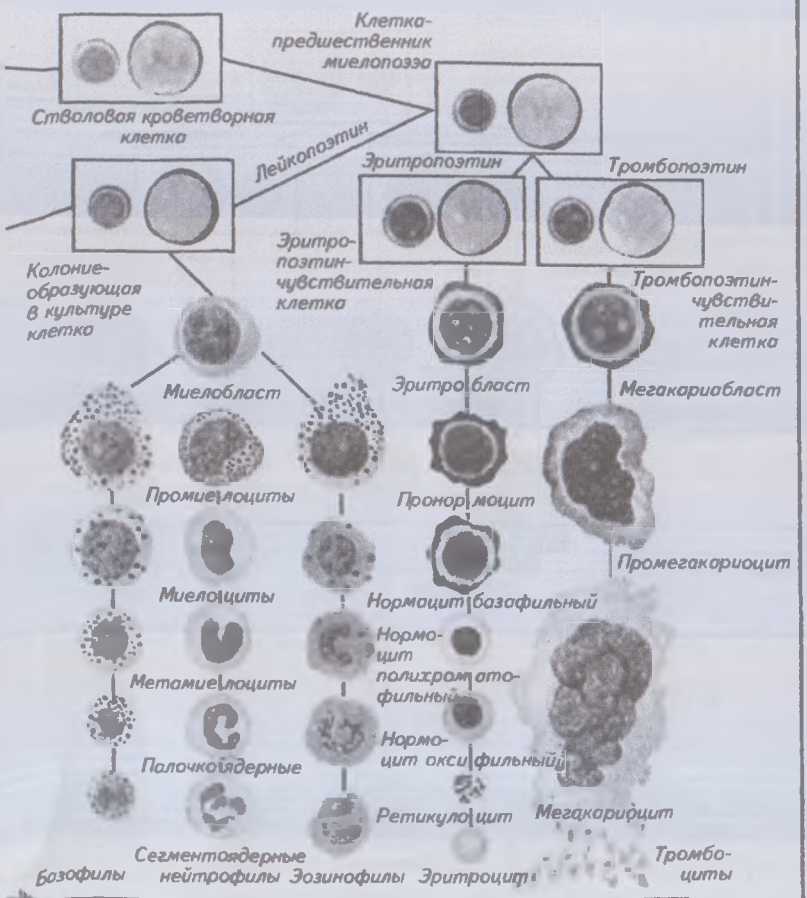


Рис. 11.
Схема кроветворения по И. Л. Черткову и А. И. Воробьеву



Макрофаги				
Свободный и фиксированный макрофаг лимфатических узлов	Перитонеальный макрофаг	Плевральный макрофаг	Остеокласт	Клетки микроглии нервной системы

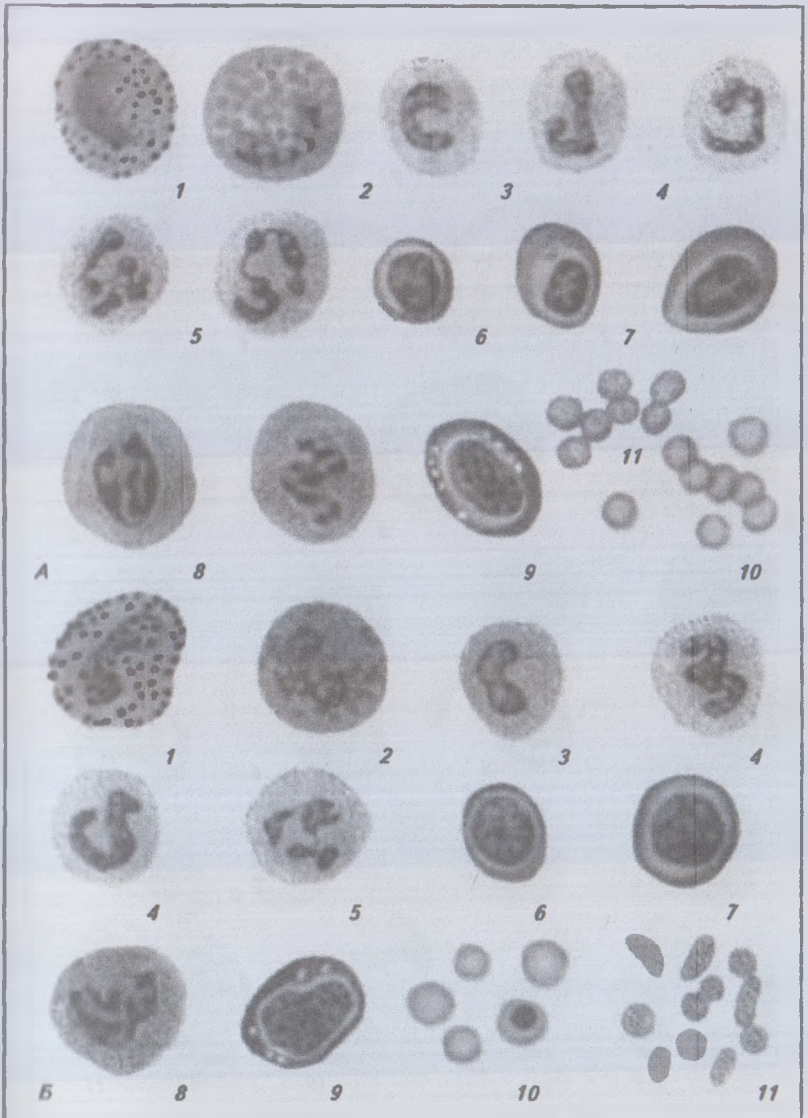


Рис. III. Форменные элементы крови:

А — лошади; *Б* — свиньи: *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — палочкоядерные нейтрофилы; *4* — сегментоядерные нейтрофилы; *5* и *6* — малый и большой лимфоциты; *7* и *8* — моноциты; *9* — клетки Тюрка; *10* — эритроциты; *11* — тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву)

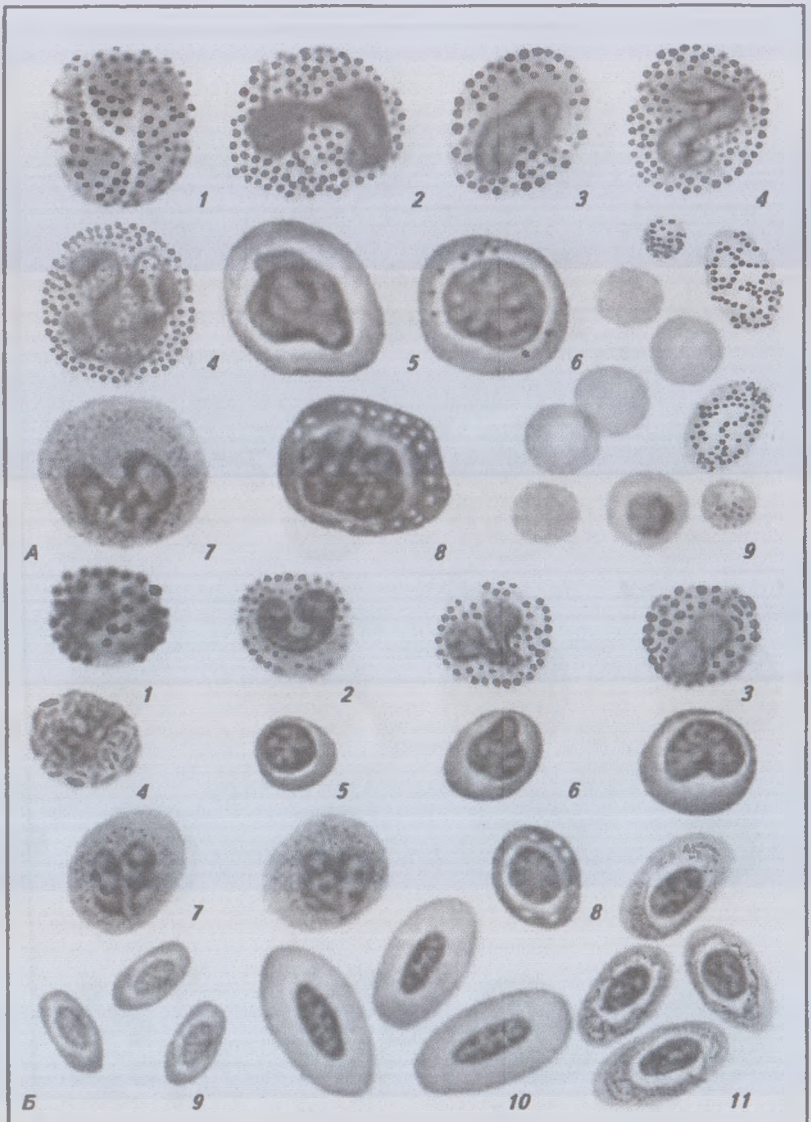


Рис. IV. Форменные элементы крови:

А — кролика; *Б* — кур; *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — палочкоядерные нейтрофилы; *4* — сегментоядерные нейтрофилы; *5* и *6* — малый и большой лимфоциты; *7* и *8* — моноциты; *9* — клетки Тюрка; *10* — эритроциты; *11* — тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву)

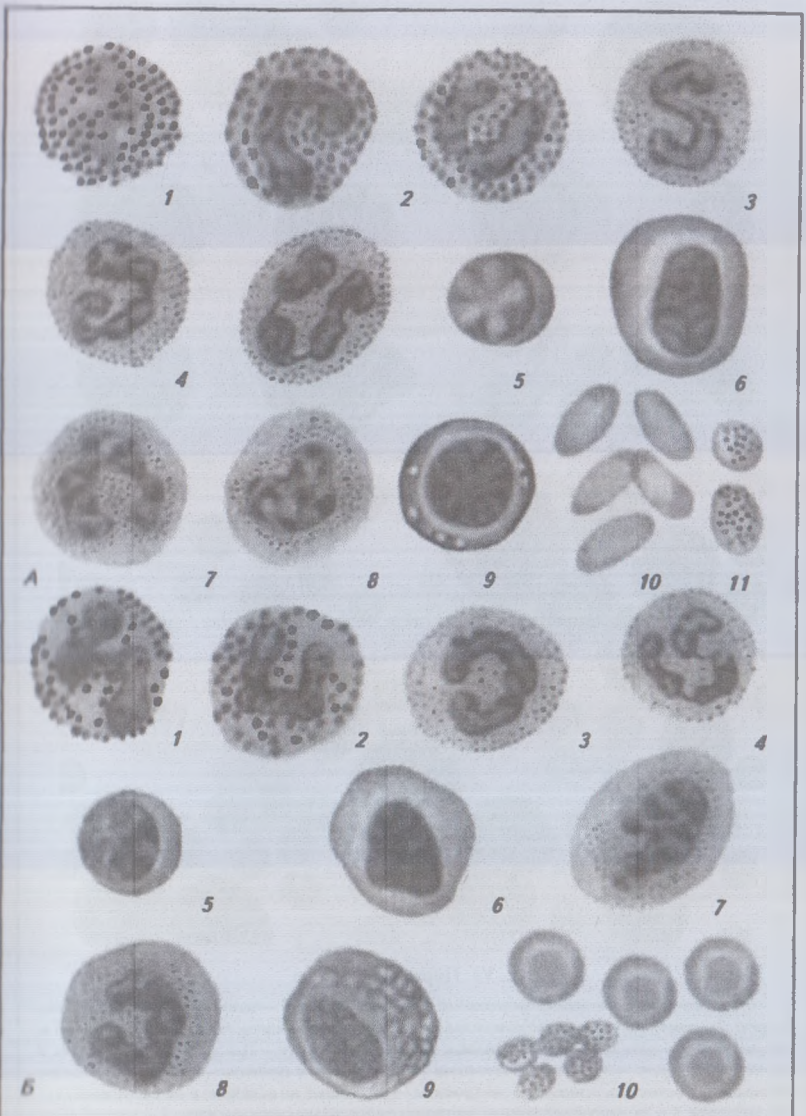


Рис. V. Форменные элементы крови:

А — верблюда; *Б* — собаки; *1* — базофилы; *2* — эозинофилы; *3* — палочкоядерные нейтрофилы; *4* — сегментоядерные нейтрофилы; *5* и *6* — малый и большой лимфоциты; *7* и *8* — моноциты; *9* — клетки Тюрка; *10* — эритроциты; *11* — тромбоциты (по Н. П. Рухлядеву)

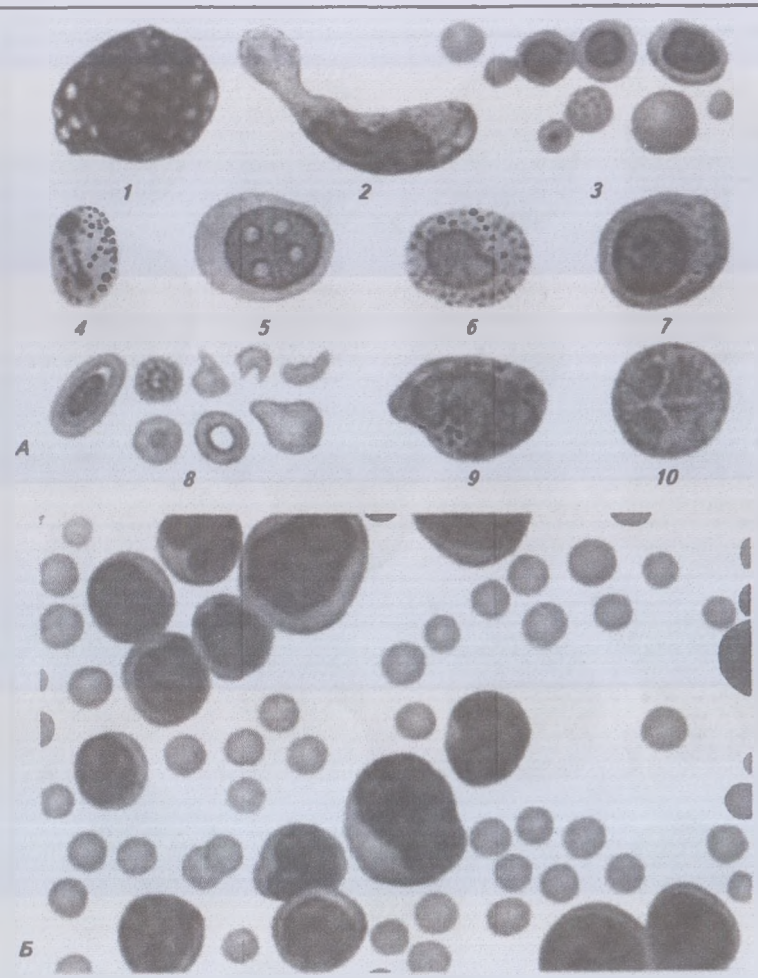


Рис. VI. Поражение крови:

А — патологически измененные форменные элементы крови; *1* — вакуолизированная клетка Тюрка; *2* — гистиоцит (ретикулоэндотелиальная клетка с фагоцитированным эритроцитом и вакуолями); *3* — патологически измененные эритроциты (*вверху* — три эритроцита с ядрами, *в левом нижнем углу* — эритроцит с тельцами Жолли, *рядом в середине* — эритроциты с базофильной зернистостью, *остальные* эритроциты — различные по величине и по насыщению гемоглобином); *4* — полиморфноядерный эритроцит с капельным распадом ядра; *5* — миелобласт; *6* — нейтрофильный миелоцит; *7* — мегалобласт; *8* — пойкилоциты (*вверху*), ретикулоциты (*в середине*), полихроматофилы (*внизу*); *9* — миелобласт с вакуолями в ядре; *10* — сегментоядерный псевдоэозинофил с резко выраженной вакуолизацией цитоплазмы (по Н. П. Рухлядеву); *Б* — лимфоциты крови коровы при лимфолейкозе

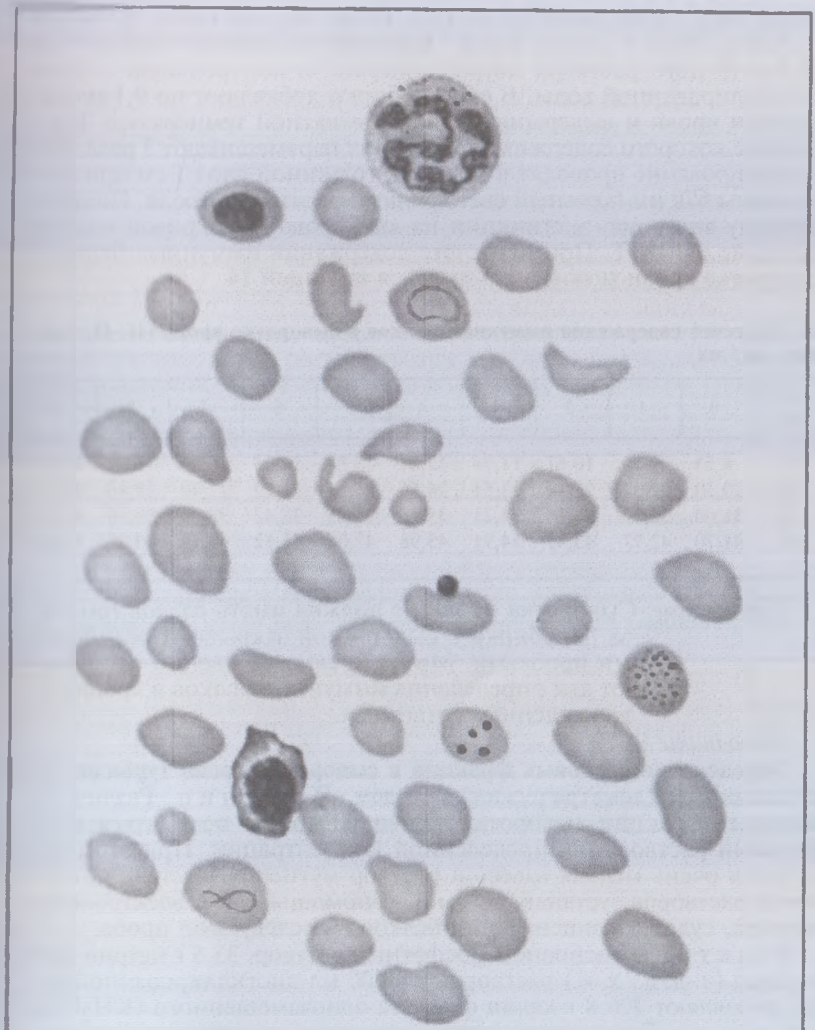


Рис. VII. Картина крови при B_{12}-дефицитной анемии:

отмечается гиперхромия, анизоцитоз эритроцитов с преобладанием макроцитов; мегалоциты, мегалобласты, эритроциты с остатками ядра в виде телец Жолли, колец Кебота; эритроциты с базофильной зернистостью; гиперсегментированный нейтрофил (по А. Г. Абрамову)

Оборудование: фотоэлектроколориметр; пробирки химические на 5, 10 мл; пипетки на 1,5 и 10 мл; мерные колбы на 100 мл.

Ход определения. В опытную пробирку вносят 6 мл 20,8 мг%-ного раствора цинка сульфата, в контрольную — 6 мл дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 0,1 мл сыворотки крови и выдерживают при комнатной температуре 1 ч, в течение которого содержимое пробирок перемешивают 3 раза. Фотометрирование проводят в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 670 нм (красный светофильтр) против контроля. По полученному значению экстинкции на калибровочной кривой находят значение ед. ЦСТ. При пересчете содержания иммунных белков в сыворотке крови можно пользоваться таблицей 14.

14. Пересчет содержания иммунных белков в сыворотке крови (Н. И. Блинов), мг/ мл

ЦСТ, ед.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	8,53	9,60	10,67	11,74	12,81	13,88	14,95	16,02	17,09	19,23
20	20,30	21,37	22,44	23,51	24,56	25,65	26,72	27,79	28,86	29,93
30	31,00	32,07	33,14	24,21	35,28	26,35	37,42	38,49	39,56	40,63
40	41,70	42,77	43,83	44,91	45,98	47,05	48,12	49,19	50,26	51,32

Примечание. Сыворотка крови не должна иметь следов гемолиза. Пробирки с сывороткой закрывают резиновыми пробками. Метод преимущественно используют для определения иммунных белков в крови новорожденных животных.

Источники: 9, 29.

Определение белковых фракций в сыворотке крови турбидиметрическим (нефелометрическим) методом. Принцип. Различные белковые фракции сыворотки крови способны осаждаться фосфатными растворами определенной концентрации. При этом образуется очень мелкая взвесь и раствор мутнеет. По степени мутности растворов, устанавливаемой с помощью фотоэлектроколориметра, судят о концентрации белков в исследуемой пробе.

Реактивы: основной фосфатный раствор. 33,5 г натрия гидроксида (ч. д. а., х. ч.) растворяют в 400 мл дистиллированной воды, добавляют 226,8 г калия фосфата однозамещенного (KH_2PO_4, ч. д. а., х. ч.). После растворения охлаждают до комнатной температуры и добавляют дистиллированную воду до объема 500 мл;

рабочие фосфатные растворы. В мерные колбы на 100 мл берут 92,4 мл (№ 1), 74,9 мл (№ 2), 58,8 мл (№ 3), 48,7 мл (№ 4) основного фосфатного раствора и доводят объем дистиллированной водой до метки. Тщательно размешивают путем встряхивания. При хранении разведенных растворов для предупреждения бактериального загрязнения добавляют по 1 капле хлороформа на 100 мл раствора.

О б о р у д о в а н и е: фотоколориметр; химические пробирки; пипетки на 1, 2, 5, 10 мл, бюретка; мерные колбы на 100 и 500 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. На каждую пробу сыворотки крови в штатив устанавливают по 6 пробирок, обозначив их № 0, 1, 2, 3, 4 и 5. В пробирку № 0 вносят 10 мл дистиллированной воды, в пробирки № 1, 2, 3 и 4 — по 5 мл соответствующих рабочих фосфатных растворов (№ 1—4). В пробирку № 5 вносят 0,5 л 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 этого переносят по 0,5 мл смеси в пробирки № 1, 2, 3, 4 и 1 мл в пробирку № 0. Содержимое пробирок тщательно, но осторожно перемешивают, избегая образования пузырьков воздуха. Через 15 мин определяют на ФЭКе оптическую плотность (*Е*) растворов при красном светофильтре в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля (проба № 0). Проводят измерение в обратной последовательности — сначала в пробирке № 4, а затем в пробирках № 3, 2 и 1.

Р а с ч е т ведут по схеме: *Е* пробирки № 1 − *Е* пробирки № 2= = *Е* альбуминов; *Е* пробирки № 2 − *Е* пробирки № 3 = *Е* α-глобулинов; *Е* пробирки № 3 − *Е* пробирки № 4 = *Е* β-глобулинов; *Е* пробирки № 4 = *Е* γ-глобулинов.

Принимая сумму *Е* альбуминов и *Е* всех глобулиновых фракций за 100 %, вычисляют содержание каждой фракции в относительных процентах. Зная концентрацию общего белка сыворотки крови, можно произвести пересчет в абсолютные величины.

Пример расчета: *Е* пробирки № 1 = 0,800; *Е* пробирки № 2 = = 0,400; *Е* пробирки № 3 = 0,300; *Е* пробирки № 4 = 0,200. Тогда *Е* альбуминов составит 0,800 − 0,400 = 0,400; *Е* γ-глобулинов 0,400 − − 0,300 = 0,100; *Е* β-глобулинов 0,300 − 0,200 = 0,100; *Е* γ-глобулинов = 0,200.

$$\text{Относительный процент альбуминов} = \frac{0{,}400 \cdot 100}{0{,}800} = 50\ \%;$$

$$\alpha\text{- и } \beta\text{-глобулинов} = \frac{0{,}100 \cdot 100}{0{,}800} = \text{по } 12{,}5\ \%;$$

$$\gamma\text{-глобулинов} = \frac{0{,}200 \cdot 100}{0{,}800} = 25{,}0\ \%.$$

Для облегчения расчета нулевые знаки в показаниях экстинкции не учитывают. Ошибка метода составляет ± 4 %.

Источники: 32, 52.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Альбумин — простой низкомолекулярный белок (40—70 тыс. дальтон), синтезируется в печени. Основные его функции — связывание воды, обеспечение коллоидно-осмотического (онкотического) давления, транспорт ионов магния, кальция, билирубина, СЖК, стероидных гормонов и других веществ эндогенного и экзогенного происхождения.

Снижение содержания альбумина наблюдается при уменьшении его синтеза, обусловленного поражением печени (гепатит, гепатоз,

цирроз, амилоидоз печени), острой и хронической пневмонией, бронхопневмонией, лейкозом и др.; при недостатке протеина в кормах, плохом его усвоении, больших потерях с мочой (алиментарная дистрофия, гипокобальтоз, диарея до наступления обезвоживания).

Увеличение содержания альбуминов встречается очень редко и чаще связано с дегидратацией организма.

Из α_1-глобулинов в сыворотке крови обнаруживают два белка: α_1-антитрипсин и α_1-гликопротеин. α_1-Антитрипсин — ингибитор ряда протеаз. Его содержание повышается при механическом повреждении тканей и воспалительных заболеваниях. α_1-Гликопротеин участвует в транспорте прогестерона и тестостерона. Содержание его возрастает при воспалительных процессах, снижается при циррозе печени.

α_2-Глобулины содержат α_2-макроглобулин, гаптоглобин и церулоплазмин. α_2-Макроглобулин — цинксодержащий гликопротеин с большой молекулярной массой. Ингибирует протеолитические ферменты трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин и калликреин. Содержание его увеличивается при циррозе печени, нефрозе, сахарном диабете, снижается при ревматоидном полиартрите.

Гаптоглобин связывает и транспортирует свободный гемоглобин А в клетки ретикулоэндотелия. Содержание его снижается при гепатите, гемолитической анемии, увеличивается при острых воспалительных процессах, сахарном диабете.

Церулоплазмин — медьсодержащий белок, окисляет трехвалентное железо в двухвалентное. Уровень его растет при остром воспалительном процессе, холестазе, ревматоидном артрите, снижается при циррозе печени, хроническом гепатите.

Содержание α_2-глобулинов в крови здоровых животных незначительное.

β-Глобулины содержат два белка — трансферин и гемопексин. Трансферин участвует в транспорте трехвалентного железа, снижается его содержание при воспалительных процессах. Гемопексин переносит сывороточный гем. Уровень его падает при гемолитической анемии, заболеваниях печени, нефротическом синдроме, повышается — при воспалительном процессе.

γ-Глобулины — иммунные белки. Уровень их повышается при инфекционном воспалительном процессе, а также за счет патологических белков — парапротеинов, относящихся к иммуноглобулинам. Увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное повышение уровня β-глобулинов при заметном снижении альбуминов присуще гепатиту, токсическому гепатозу, лейкемии, злокачественным новообразованиям, воспалению легких и бронхов.

Снижение γ-глобулинов отмечают у новорожденных животных при физиологической незрелости иммунной системы, иммунных дефицитах. Гипогаммаглобинемию отмечают при белковом недокорме, истощении, воздействии на организм радиации.

Выраженное увеличение количества α-глобулинов с умеренным снижением альбуминов характерно для поздней стадии пневмонии, хронического эндокардита, холецистита, уроцистита, пиелита, токсикозов беременности.

Повышение уровня α_2- и β-глобулинов при значительном снижении количества γ-глобулинов бывает при липоидном и амилоидном нефрозе, нефрите, нефросклерозе, токсикозе беременности, кахексии, злокачественных новообразованиях.

Значительное увеличение содержания γ-глобулинов, умеренное увеличение β-глобулинов при заметном снижении количества альбуминов присуще гепатитам, токсическому гепатозу, кетозу, гемолитическим процессам, лейкемиям и злокачественным новообразованиям кроветворного и лимфатического аппарата.

При циррозе печени, коллагенозе и некоторых других болезнях наблюдают значительное снижение содержания альбуминов и заметное увеличение γ-глобулинов. Для механической желтухи характерно уменьшение уровня альбуминов и умеренное увеличение содержания α_2-, β- и γ-глобулинов.

Определение мочевины в сыворотке крови по цветной реакции с диацетилмонооксимом. П р и н ц и п. Мочевина в кислой среде образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбозида и солей железа окрашенное соединение, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию мочевины в сыворотке крови или моче.

Р е а к т и в ы: трихлоруксусная кислота, 100 г/л;

диацетилмонооксим, 25 г/л воды. Реактив стабилен при хранении в темной посуде;

0,25%-ный раствор тиосемикарбозида (или 0,32%-ный раствор тиосемикарбозида гидрохлорида). Реактивы устойчивы при хранении в посуде из темного стекла;

серная кислота концентрированная;

85%-ная ортофосфорная кислота;

железа хлорат;

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

рабочий раствор железа хлората. 1 мл основного раствора железа хлората доводят до 100 мл дистиллированной водой, добавляют 8 мл концентрированной серной кислоты и 1 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты. Хранят в темной посуде. Реактив годен в течение 2 нед;

цветной реактив. К 30 мл рабочего раствора железа хлората добавляют 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора диацетилмонооксима и 0,25 мл 0,25%-ного раствора тиосемикарбозида. Цветной реактив готовят каждый раз перед употреблением;

калибровочный раствор мочевины — 25 мг%. 250 мг мочевины (х. ч.), высушенной в сушильном шкафу при 105 °С до постоянной массы, растворяют в мерной колбе на 1 л дистиллированной водой. В качестве растворителя можно использовать 0,2%-ный раствор бензойной кислоты (0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды при интенсивном помешивании и нагревают на водяной бане). Стандарт, приготовленный на растворе бензойной кислоты, более стабилен, чем водный. Оба раствора при работе должны давать небольшие колебания экстинкции на ФЭКе. В ином случае требуется приготовить новый стандартный раствор.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня; центрифуга; центрифужные пробирки; алюминиевая фольга.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 0,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл сыворотки крови и 1 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Перемешивают и оставляют на 10—20 мин, центрифугируют 15—20 мин при 3000 мин$^{-1}$. В чистую пробирку вносят 0,5 мл прозрачной надосадочной жидкости (не взмучивая осадок) и 5 мл цветного реактива. Пробирку закрывают резиновой пробкой, обернутой алюминиевой фольгой, выдерживают в кипящей водяной бане 20 мин (точно) и затем охлаждают в течение 2—3 мин под струей водопроводной воды. Измерение проводят на ФЭКе при длине волны 530—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 1 см не позднее чем через 15 мин после охлаждения.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо надосадочной жидкости берут 0,5 мл дистиллированной воды. Одновременно определяют содержание мочевины в стандартной пробе. Стандартную пробу обрабатывают аналогично опытной, но вместо сыворотки берут 0,2 мл стандартного раствора мочевины.

Расчет проводят по формуле

$$x = \frac{E_{оп}}{E_{ст}} \cdot 25,$$

где x — концентрация мочевины в сыворотке крови, мг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; 25 — концентрация мочевины в калибровочном растворе, мг%.

Для перевода мг% в ммоль/л полученную величину умножают на коэффициент 0,1665. Ошибка метода составляет ±4 %.

Источник: 43.

Клиническое значение. Мочевина — основной конечный продукт азотистого обмена. Синтезируется главным образом в печени, а у жвачных животных, кроме того, в стенке рубца из азота аммиака, аминокислот и амидов. Непосредственный предшественник мочевины в печени — гуанидиновая группировка аминокислоты аргинина. На долю мочевины приходится не менее половины остаточного азота крови и 80—83 % мочи.

Мочевина главным образом выделяется почками, у жвачных животных часть ее поступает в преджелудки со слюной, где распадается до аммиака и углекислого газа с последующим использованием продуктов распада рубцовой микрофлорой. Концентрация мочевины в крови у здоровых животных колеблется от 20 до 40 мг% (3,33—6,66 ммоль/л).

Значительное *повышение содержания мочевины в крови* (уремия) наблюдается при циркуляторной недостаточности почек, при которой нарушается фильтрация в клубочках. Такая патология возникает при сердечной недостаточности и дегидратации. Наиболее частые причины уремии — заболевания, при которых поражаются преимущественно почечные клубочки (хронический нефрит), или задержка выделения мочи при мочекаменной болезни, аденоме предстаты и др. Уремией сопровождается почечная недостаточность.

Повышение содержания мочевины в крови наблюдали при алкалозе рубца, скармливании животным большого количества гороха, зеленых бобовых кормов (вико-овсяная смесь, горохо-овсяная смесь). Резкую уремию (до 200 мг%) наблюдают у тяжело больных диспепсией телят (И. П. Кондрахин).

Продукционная гиперазотемия возникает при механических повреждениях тканей, обширных ожогах, лихорадочных состояниях, когда идет усиленный распад тканевых белков.

Тяжесть уремии связана не с концентрацией самой мочевины (она малотоксична), а с накоплением токсических производных гуанидина — гуанидинянтарной кислоты, метилгуанидина, гуанидинуксусной и гуанидинпропионовой кислот, которые образуются в организме вследствие нарушения нормального синтеза мочевины из аргинина.

Уменьшение содержания мочевины в крови бывает при длительном белковом недокорме, при нарушении мочевинообразовательной функции печени, наблюдаемой при кетозе коров.

Определение свободного аминного азота в сыворотке крови по методу Г. А. Узбекова в модификации З. С. Чулковой. Под свободным аминным азотом (аминазот) понимают азот свободных аминокислот сыворотки (плазмы крови). Общий аминный азот крови включает кроме азота свободных аминокислот азот сложных полипептидов и белков. Из существующих методов определения свободного аминазота крови наиболее распространены нингидриновые, один из которых приведен ниже.

Принцип. Аминокислоты при взаимодействии с нингидрином подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию. Нингидрин, восстанавливаясь, вступает в реакцию с продуктами этой реакции — образуется соединение, окрашенное в фиолетовый цвет. Интенсивность окрашивания при определенных условиях пропорциональна количеству свободных аминокислот.

Р е а к т и в ы: 0,04 моль/л раствор уксусной кислоты — 0,23 мл ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH) на 100 мл воды; 1%-ный раствор нингидрина.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; водяная баня; пробирки с меткой на 10 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. Исследование проводят поэтапно.

1. Осаждение белков. В центрифужную пробирку вносят 0,5 мл сыворотки крови, 0,5 мл 0,04 моль/л раствора ледяной уксусной кислоты, закрывают пробкой и помещают в холодную водяную баню, которую доводят до кипения. Пробы прогревают в водяной бане в течение 5 мин (с момента закипания). Затем пробирки охлаждают и содержимое их фильтруют.

2. Фильтрование. К содержимому пробирки добавляют 1 мл дистиллированной воды, перемешивают тонкой стеклянной палочкой и фильтруют через гладкий бумажный фильтр. Пробирку и осадок на фильтре промывают еще 2 раза по 1 мл водой, после чего основной фильтрат и промывные воды объединяют в одну пробирку с меткой на 10 мл.

3. Цветная реакция с нингидрином. К полученному фильтрату добавляют 0,5 мл 1%-ного водного раствора нингидрина, содержимое пробирки перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 20 мин. Затем пробирку охлаждают в водопроводной воде, оставляют стоять 5 мин при комнатной температуре и доводят объем дистиллированной водой до 10 мл (по метке на пробирке). Одновременно ставят контроль на реактивы. К 3 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 мл 0,04 моль/л раствора ледяной уксусной кислоты, 0,5 мл 1%-ного водного раствора нингидрина, перемешивают, прогревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин, охлаждают под струей водопроводной воды и доводят дистиллированной водой до 10 мл. В качестве контроля можно пользоваться обычной дистиллированной водой.

4. Колориметрия. Оптическую плотность пробы измеряют на ФЭКе при длине волны 536 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контроля или дистиллированной воды.

Р а с ч е т. По калибровочной кривой, построенной по азоту аланина или другой какой-либо аминокислоты с известным содержанием азота (кроме триптофана, лизина, цистина), находят количество мкг азота, соответствующее полученным значениям экстинкций.

Для перевода в мг% найденный результат умножают на 200 и делят на 1000, т. е. умножают на 0,2 (в случае, если берут 0,5 мл сыворотки).

Пример: экстинкция пробы составляет 0,212, а количество азота, найденное по калибровочной кривой, — 16,42 мкг. Отсюда концентрация аминного азота представляет величину $16{,}42 \cdot 0{,}2 = 3{,}284$ мг% аминного азота.

Аналогичный результат можно получить при следующей пропорции:

0,5 мл сыворотки — 16,42 мкг

100 мл сыворотки — x,

$$x = (16{,}42 \cdot 100) : 0{,}5 = 3284 \text{ мкг\%} = 3{,}284 \text{ мг\%}.$$

Клиническое значение. У здоровых животных в сыворотке (плазме) крови содержится от 4 до 8 мг% свободного аминного азота.

Снижается количество аминного азота при длительном недокорме, голодании, нефрозе, хронических расстройствах функций желудочно-кишечного тракта, при жировой дистрофии печени вследствие кетоза.

Повышается уровень аминного азота в крови после приема богатого протеином корма, острой токсической дистрофии печени (печеночной коме), отравлении фосфором и другими ядами, лихорадке.

Источник: 32.

Определение мочевой кислоты в сыворотке крови по реакции с фосфорно-вольфрамовым реактивом. Для определения мочевой кислоты в сыворотке крови используют колориметрические, энзиматические и другие методы. Наиболее специфичные и точные — ферментативные (уреазные) методы, однако их выполнение затруднительно, поэтому в качестве унифицированного метода в клинико-диагностических целях используется фосфорно-вольфрамовый карбонатный метод.

Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив с образованием соединения голубого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты.

Реактивы: серная кислота (ч. д. а., х. ч.), 0,35 моль/л. К 200 мл дистиллированной воды добавляют 10 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) и доводят объем водой до 500 мл;

натрий вольфрамовокислый двухводный ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, ч. д. а.), 100 г/л. Растворяют 50,0 г вольфрамовокислого натрия в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем до 500 мл;

натрия карбонат (Na_2CO_3, ч. д. а.), 103 г/л. Растворяют 51,5 г натрия карбоната в небольшом количестве дистиллированной воды и доводят объем до 500 мл;

85%-ная ортофосфорная кислота (ч. д. а.);

лития сульфат ($Li_2SO_4 \cdot H_2O$, ч. д. а.);

лития карбонат (Li_2CO_3, ч. д. а.);

фосфорно-вольфрамовый реактив. В круглодонную колбу вместимостью 1,5 л вносят 40,0 г вольфрамовокислого натрия и 300 мл дистиллированной воды. Добавляют 32 мл 85%-ной ортофосфорной кислоты и несколько стеклянных бусинок. Осторожно кипя-

тят в течение 2 ч на песочной или глицериновой бане с обратным холодильником. Охлаждают до комнатной температуры и доливают дистиллированной водой до 1 л. Добавляют 32,0 г лития сульфата. Раствор стабилен при хранении в холодильнике;

мочевая кислота (имп.);

формалин, не менее 37,5 % формальдегида;

основной калибровочный раствор мочевой кислоты, 6 ммоль/л. Растворяют 0,6 г карбоната лития в 150 мл дистиллированной воды, фильтруют и нагревают до 60 °С. Взвешивают 1,017 г мочевой кислоты, вносят в предварительно нагретую мерную колбу вместимостью 1 л, вливают теплый раствор лития карбоната и быстро встряхивают. После растворения мочевой кислоты колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 20 мл раствора формалина, наливают 300—350 мл дистиллированной воды. Добавляют несколько капель раствора метилового оранжевого, затем встряхивают, медленно добавляют 20—22 мл 0,35 моль/л серной кислоты до появления розового цвета. Доливают колбу до метки дистиллированной водой. Раствор стабилен при хранении в холодильнике в посуде из темного стекла. 1 мл раствора содержит 0,006 ммоль/1 мг мочевой кислоты;

рабочий калибровочный раствор мочевой кислоты, 0,3 ммоль/л. 5 мл основного калибровочного раствора в мерной колбе доводят до 100 мл дистиллированной водой. Стабилен в течение 2 нед при хранении в холодильнике.

О б о р у д о в а н и е: фотоэлектроколориметр; баня песочная или глицериновая; обратный холодильник.

Х о д о п р е д е л е н и я. *Опытная проба.* К 8 мл дистиллированной воды прибавляют 1 мл сыворотки, 0,5 мл 0,35 моль/л серной кислоты и перемешивают. Добавляют 0,5 мл раствора вольфрамовокислого натрия и тщательно перемешивают. Через 5—10 мин фильтруют. К 3 мл фильтрата добавляют 1,5 мл раствора натрия карбоната, перемешивают. Затем добавляют 1 мл фосфорно-вольфрамового реактива, перемешивают, переворачивая пробирку. Через 30 мин измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 590—700 нм (красный светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба. Ставят так же, как опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл дистиллированной воды.

Калибровочная проба. Ставят и измеряют так же, как опытную, но вместо фильтрата берут 3 мл рабочего калибровочного раствора с содержанием 0,3 ммоль/л мочевой кислоты.

Концентрация мочевой кислоты (x) в ммоль/л составит

$$x = \frac{E_{оп}}{E_к} C_к,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_к$ — экстинкция калибровочной пробы; $C_к$ — концентрация рабочего калибровочного раствора, содержащего 0,3 ммоль/л мочевой кислоты, ммоль/л.

При пересчете ммоль/л в мг% полученную величину делят на 0,059 или умножают на 16,94.

Например, найденная величина мочевой кислоты составила 0,24 ммоль/л, это будет соответственно 4,06 мг%.

Источник: 55.

Определение мочевой кислоты в сыворотке крови животных с использованием заводского набора реактивов. Принцип. Мочевая кислота восстанавливает фосфорно-вольфрамовый реактив с образованием комплекса голубого цвета. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации мочевой кислоты.

Реактивы: раствор натрия вольфрамата 10 %-ный; реактив Фолина; раствор натрия карбоната; раствор калибровочный мочевой кислоты 0,3 ммоль/л; раствор серной кислоты 0,35 моль/л.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; две кюветы с толщиной слоя 1 см; пипетки; шприц для отбора центрифугата; центрифуга.

Ход определения. *Опытная проба.* К 5 мл дистиллированной воды добавляют 0,4 мл сыворотки, 0,2 мл раствора серной кислоты, перемешивают. Затем добавляют 0,2 мл раствора натрия вольфрамата, перемешивают и через 10 мин центрифугируют при 3000 $мин^{-1}$ 15 мин. Отбирают 3 мл центрифугата, последовательно добавляют 0,6 мл натрия карбоната и 0,4 мл реактива Фолина, перемешивают и через 30 мин фотометрируют в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы при длине волны 670 нм.

Холостая проба. К 3 мл воды добавляют 0,2 мл раствора серной кислоты, 0,2 мл натрия вольфрамата, 0,6 мл раствора карбоната натрия и 0,4 мл реактива Фолина.

Калибровочная проба. К 5 мл воды добавляют 0,4 мл калибровочного раствора мочевой кислоты, 0,2 мл раствора серной кислоты, 0,2 мл раствора натрия вольфрамата, перемешивают. Через 10 мин отбирают 3 мл и прибавляют 0,6 мл раствора натрия карбоната и 0,4 мл реактива Фолина. Через 30 мин фотометрируют при тех же условиях, что и опытную пробу.

Концентрация мочевой кислоты в сыворотке крови (x, ммоль/л, л) составит

$$x = \frac{E_{оп}}{E_к} \cdot 0{,}3,$$

где $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_к$ — экстинкция калибровочной пробы; 0,3 — концентрация мочевой кислоты в калибровочном растворе, ммоль/л.

При переводе в мг% полученную величину в ммоль/л умножают на 16,94.

Источник: 43.

Клиническое значение. Мочевая кислота у птиц, а также у человека является конечным продуктом обмена пуриновых нуклеиновых оснований, у лошадей, собак и кроликов она

окисляется с образованием алантоина. Мочевая кислота плохо растворима в воде, ее соли — ураты откладываются на висцеральных оболочках брюшины, внутренних органов, в суставах и мочевыводящих путях, вызывая мочекислый диатез, а при отложении в суставах — подагру. Мочекислый диатез и подагра преимущественно встречаются у птиц и человека.

В норме мочевой кислоты у кур содержится 0,23—0,47 ммоль/л, или 4—8 мг/100 мл мочевой кислоты. *Повышение ее уровня* в сыворотке крови у кур отмечается при избыточном протеиновом и аминокислотном кормлении, избытке нитратов, недостатке витамина А и др.

Определение креатинина в сыворотке крови по цветной реакции Яффе (метод Лоппера). Принцип. Креатинин реагирует с пикриновой кислотой в щелочной среде с образованием окрашенных соединений. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации креатинина.

Реактивы: насыщенный раствор пикриновой кислоты. Влажность товарной пикриновой кислоты 15—20 %. Кислоту не сушат! Взрывоопасна! 2 г пикриновой кислоты растворяют в 100 мл горячей (70—80 °С) дистиллированной воды при нагревании в водяной бане. Раствор оставляют стоять на 24 ч, периодически перемешивая, затем фильтруют. Реактив стоек. Хранят в темной посуде;

0,1 моль/л HCl;

основной калибровочный раствор креатинина, 10 моль/л: 113 мг креатинина доводят до 100 мл 0,1 моль/л раствором HCl. Хранят в холодильнике в посуде с притертой пробкой. Рабочий калибровочный раствор получают разведением основного калибровочного раствора дистиллированной водой в 100 раз. 1 мл раствора содержит 0,1 ммоль/л (1 мг%) креатинина;

натрия гидроксид, 2,5 моль/л (10%-ный раствор).

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня; колбы мерные.

Ход определения. *Опытная проба.* 2,0 мл сыворотки смешивают с 6,0 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты. Через 5 мин пробирку помещают на 15—20 с в кипящую водяную баню, затем центрифугируют или фильтруют. К 4 мл центрифугата добавляют 0,2 мл 2,5 моль/л раствора натрия гидроксида и тщательно перемешивают. Иногда после подщелачивания раствор мутнеет вследствие выпадения фосфатов. В этом случае его следует еще раз отцентрифугировать. Затем раствор доводят до объема 10 мл дистиллированной водой. Через 10 мин (не позже) измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 2 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостая проба. 3 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и 0,2 мл 2,5 ммоль/л раствора натрия гидроксида доводят до объема 10 мл водой.

Калибровочную пробу обрабатывают точно так же, как и опытную, но вместо сыворотки крови берут 2 мл рабочего 0,1 ммоль/л (1 мг%) раствора креатинина; пробу при этом не центрифугируют. Можно строить калибровочный график. Из рабочего калибровочного раствора креатинина готовят разведения, как указано в таблице 15.

15. Разведения рабочего калибровочного раствора креатинина

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор, мл	Раствор пикриновой кислоты, мл	2,5 моль/л раствор натрия гидроксида, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация креатинина в пробе, мкмоль/л
1	0,4	3,0	0,2	До объема 10 мл	40
2	0,8	3,0	0,2	То же	80
3	1,6	3,0	0,2	»	160
4	2,4	3,0	0,2	»	240
5	3,2	3,0	0,2	»	320

Через 10 мин проводят измерения при тех же условиях, что и опытные пробы. Калибровочная кривая линейна до 260 мкмоль/л креатинина.

Р а с ч е т концентрации креатинина в сыворотке ведут по формуле

$$x = \frac{E_{оп}}{E_к} \cdot 0{,}1 \text{ или } \frac{E_{оп}}{E_к} \cdot 1,$$

где x — содержание креатинина в сыворотке, ммоль/л или мг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_к$ — экстинкция калибровочной пробы; 0,1 концентрация креатинина в калибровочной пробе, ммоль/л; 1 — концентрация креатинина в калибровочной пробе, мг%.

При переводе в мг% полученную величину умножают на 10.

Источник: 43.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В организме животных креатинин образуется из креатина, источники которого аминокислоты аргинин, глицин, метионин. Креатин при фосфорилировании превращается в креатинфосфат, а затем в креатинин. Креатин и креатинфосфат участвуют в процессах, связанных с мышечными сокращениями.

В сыворотке крови содержится в основном креатинин, поэтому его и определяют. Количество его у животных различных видов колеблется от 40 до 160 мкмоль/л (0,45—1,9 мг%), у кур — 120—350 мкмоль/л (1,4—4,0 мг%).

Повышение концентрации креатинина в крови наблюдается при почечной недостаточности, прогрессирующих диффузных заболеваниях почек, закупорке мочевых путей, подагре, кишечной не-

проходимости, механической желтухе, голодании, мышечной дистрофии.

Понижение количества креатинина не имеет клинического значения.

Определение билирубина в сыворотке крови по диазореакции (метод Ендрассика—Клеторна—Грофа). Принцип. Под действием HCl разрывается тетрапирроловая связь билирубина и образуется два дипиррола, которые диазотируются диазобензосульфановой кислотой с образованием розово-фиолетового азобилирубина. Связанный билирубин реагирует быстро, несвязанный — после добавления кофеинового реактива.

Реактивы: кофеиновый реактив. 5 г чистого кофеина, 7,5 г натрия бензоата, 12,5 г натрия ацетата растворяют в 90 мл дистиллированной воды, нагревают до 50—60 °С, хорошо перемешивают. После охлаждения доводят дистиллированной водой до 100 мл. Срок хранения 2 нед;

натрия хлорид (ч. д. а. или х. ч.), 154 моль/л. 0,9 г натрия хлорида помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки.

HCl концентрированная (ч. д. а., х. ч.);

сульфаниловая кислота (ч. д. а.);

диазореактив I. 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при нагревании в 300—400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl (плотность 1,19 кг/м^3). Если сульфаниловая кислота полностью не растворяется, колбу помещают в теплую воду и помешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствор доливают дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранят в посуде из темного стекла;

диазореактив II. Натрия нитрит ($NaNO_2$, ч. д. а., х. ч.), 5 г/л (0,07 моль/л). 0,5 г натрия нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки. Реактив стабилен в течение 2 нед при хранении в посуде из темного стекла. Перед работой смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II;

билирубин для построения калибровочного графика, 800 мг/л, или 1368 мкмоль/л. Коммерческие препараты кристаллического билирубина содержат разные примеси, которые могут мешать реакции азосочетания. Рекомендуется использовать наборы отечественных или зарубежных фирм, содержащие билирубин высокой степени чистоты. Растворы билирубина нестойкие, поэтому их готовят с добавлением белка в качестве стабилизатора;

натрия карбонат, 0,1 моль/л. 10,6 г безводного Na_2CO_3 растворяют и доводят до 1 л дистиллированной водой;

уксусная кислота, 4 моль/л. 25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; колбы мерные.

Ход определения. В 3 пробирки (для общего и связанного билирубина и для контроля) вносят реактивы, как указано в таблице 16.

16. Смеси реактивов для определения билирубина в сыворотке крови

Ингредиент	Опытная проба, мл		Холостая проба, мл
	Общий билирубин	Связанный билирубин	
Сыворотка крови (негемолизированная)	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	—	1,75
Раствор натрия хлорида	—	1,75	0,25
Диазосмесь	0,25	0,25	—

Для определения связанного билирубина измерение на фотоэлектроколориметре проводят через 5—10 мин после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии в реакцию вступает несвязанный билирубин. Для определения общего билирубина пробу для развития окраски оставляют на 20 мин, после чего измеряют на ФЭКе. В дальнейшем окраска не изменяется.

Измерение проводят при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против воды. Из показателей, полученных при колориметрировании общего и связанного билирубина, вычитают показатель контроля.

Расчет ведут по калибровочному графику. Находят содержание общего и связанного билирубина. Для определения уровня непрямого билирубина вычитают из показателя общего его содержания показатель прямого билирубина.

Способ 1. Калибровочный график строят по *способу Шелонга—Венде* с использованием стабилизирующего свойства белка сыворотки крови.

Реактивы для построения калибровочного графика. 1. Основной раствор билирубина. Препараты кристаллического билирубина отличаются по своим свойствам. Не каждый билирубин может быть использован для построения калибровочного графика. Допустим лишь тот билирубин, 1 мг%-ный раствор которого при растворении в хлороформе (для наркоза) при 25 °С дает на спектрофотометре абсорбцию от 1,01 до 1,07 при длине волны 453 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

В колбе вместимостью 50 мл растворяют 40 мг билирубина (имеющийся в продаже билирубин является непрямореагирующим) в 30—35 мл 0,1 моль/л раствора карбоната натрия (10,6 г безводного Na_2CO_3 доводят до 1 л дистиллированной водой) и хорошо перемешивают, не допуская образования пузырьков. Доводят до 50 мл 0,1 моль/л раствором Na_2CO_3 и несколько раз перемеши-

вают. Раствор стоек только в течение 10 мин от начала приготовления. В дальнейшем билирубин окисляется.

2. Рабочий раствор билирубина. К 13,9 мл свежей негемолизированной сыворотки крови добавляют 2 мл свежеприготовленного раствора билирубина и 0,1 мл (4 моль/л) раствора уксусной кислоты (25 мл ледяной уксусной кислоты доводят до 100 мл дистиллированной водой). Хорошо перемешивают. При этом выделяются пузырьки углекислого газа. Рабочий раствор стоек в течение нескольких дней. Он содержит на 10 мг% билирубина больше, чем сыворотка, взятая для приготовления раствора. Чтобы исключить при расчетах количество билирубина, содержащегося в этой сыворотке крови, при измерении на ФЭКе из величины экстинкции калибровочных проб вычитают величины экстинкции соответствующих разведений компенсационной жидкости.

Для приготовления компенсационной жидкости смешивают 13,9 мл той же сыворотки, которая использовалась для приготовления калибровочного раствора билирубина, 2 мг 0,1 моль/л раствора Na_2CO_3 и 0,1 мл 4 моль/л раствора уксусной кислоты.

Для построения калибровочного графика готовят ряд разведений с различным содержанием билирубина (табл. 17).

17. Разведения билирубина для построения калибровочного графика

№ пробирки	Рабочий раствор билирубина, мл	0,9%-ный раствор натрия хлорида, мл	Количество билирубина в пробе		Концентрация билирубина в сыворотке крови, мкмоль/л
			мг	мкмоль/л	
1	0,05	0,45	0,005	0,00855	17,1
2	0,1	0,4	0,01	0,0171	34,2
3	0,15	0,35	0,015	0,02565	51,3
4	0,2	0,3	0,02	0,0342	68,4
5	0,25	0,25	0,025	0,04275	85,5

К полученным разведениям прибавляют по 1,75 мл кофеинового реактива и по 0,25 мл диазосмеси. При появлении помутнения можно добавить по 3 капли 30%-ного раствора натрия гидроксида. Измерение проводят при тех же условиях, что и в опытных пробах, через 20 мин. Из компенсационной жидкости готовят разведения аналогично калибровочным (см. табл. 17) и далее обрабатывают их так же, как калибровочные пробы.

Способ 2. Калибровочный график строят по готовым наборам реактивов, выпускаемых отечественными и зарубежными фирмами. Калибровочная кривая линейна до 170 мкмоль/л.

Подбор реактивов в коммерческих наборах основан также на диазореакции, положенной в основу метода Ендрассика—Клеггорна—Графа.

Примечание. Сыворотка или плазма крови должны быть свежими, свободными от гемолиза, прозрачными. Плазму или сыворотку крови хранят не более двух дней при температуре 4—25 °С. Исследования проводят незамедлительно. Образцы крови защищают от света.

Источник: 43.

Определение билирубина в сыворотке крови животных по методу Гладрассика—Клегторна—Грофа в модификации В. И. Левченко и И. П. Влизло. Принцип метода и реактивы: условия анализов те же, что в предыдущей методике, принятой в качестве унифицированной.

Ход определения. В 4 пробирки вносят по 0,5 мл разведенной в 2 раза сыворотки крови. Первая пробирка является контролем для определения общего билирубина. В нее вносят 0,25 мл изотонического раствора натрия хлорида и 1,75 мл кофеинового реактива. Во второй пробирке определяют содержание общего билирубина: вносят 0,25 мл диазореактива и 1,75 мл кофеинового реактива. Третья пробирка — контроль для связанного билирубина. В нее вносят 2 мл изотонического (0,9%-ного, 154 ммоль/л) раствора натрия хлорида. В четвертую пробирку вносят 1,75 мл изотонического раствора натрия хлорида и 0,25 мл диазосмеси и определяют связанный билирубин (табл. 18).

18. Схема постановки реакции для определения билирубина

Реактив, мл	Контроль для общего билирубина, мл	Общий билирубин, мл	Контроль для связанного билирубина, мл	Связанный билирубин, мл
Разведенная сыворотка 1: 1	0,5	0,5	0,5	0,5
Кофеиновый реактив	1,75	1,75	—	—
0,9%-ный раствор NaCl	0,25	—	2	1,75
Диазосмесь	—	0,25	—	0,25

Из показателя оптической плотности проб общего и связанного билирубина вычитают показатель оптической плотности контрольных проб и по калибровочному графику определяют содержание общего и связанного билирубина в мг/100 мл сыворотки крови или в мкмоль/л, а по разнице между ними — содержание свободного (неконъюгированного) билирубина.

Источник: 20.

Клиническое значение. Билирубин — желчный пигмент, образуется в клетках ретикулоэндотелиальной системы печени и селезенки при распаде гемоглобина, миоглобина, цитохромов. Он ядовит, плохо растворим в воде. При поступлении с кровью в печень в гепатоцитах происходит обезвреживание его пу-

тем присоединения глюкуроновой кислоты. Соединения билирубина с глюкуроновой кислотой (моно- и диглюкурониды) растворимы в воде и непосредственно реагируют с диазореактивом. В этих соединениях заключен так называемый прямой (связанный) билирубин, который выделяется в желчь и поступает в кишечник, где превращается в уробилиноген.

В сыворотке крови животных содержится билирубин, связанный с глюкуроновой кислотой, или прямореагирующий, и конъюгированный свободный непрямореагирующий билирубин.

Повышение содержания билирубина в сыворотке крови (гипербилирубинемия, желтуха) отмечается при гепатите, циррозе печени, острой токсической гепатодистрофии, опухолях печени. При этих болезнях увеличивается уровень в крови как несвязанного (свободного), так и связанного (конъюгированного) билирубина. При гемолитической желтухе, обусловленной гемолитическими ядами или кровопаразитами (протозоо), концентрация билирубина в крови повышается в основном за счет свободного (несвязанного) билирубина. В последнее время разделению билирубина на фракции в клинике не придают особого значения, оценивают в основном количество общего билирубина.

Коллоидно-осадочные пробы. Для оценки белковосинтетизирующей функции печени, диагностики и прогнозирования бронхопневмонии и других патологических состояний широко используют осадочные пробы. Применение их основано на изменениях коллоидной устойчивости белков в сыворотке крови.

У здоровых животных белки в сыворотке крови находятся в коллоидном состоянии и отличаются высокой устойчивостью. При многих заболеваниях изменяется белковый спектр сыворотки крови, наступает диспротеинемия — снижение содержания альбуминов и повышение количества глобулинов, вследствие чего коллоидная устойчивость белков сыворотки крови снижается, под действием определенных веществ наступает преципитация, приводящая к помутнению.

Предложено много осадочных проб с применением реакции Токата (пробы Токата, Гросса, сулемовая); тимоловая проба; кофеин-холестериновая проба; цинк-сульфатная проба; реакция Вальтмана; золото-коллоидная проба; проба с сульфатом меди и др.

Хотя осадочные пробы не специфические, однако позволяют устанавливать степень нарушения соотношений между альбуминами и глобулинами сыворотки крови. Положительные коллоидно-осадочные пробы чаще обусловлены увеличением содержания глобулинов и уменьшением количества альбуминов. Ускорение коллоидно-осадочных реакций наблюдается также вследствие увеличения грубодисперсных белков —γ-глобулинов при нормальном коэффициенте альбуминов (глобулинов).

Осадочные пробы в сочетании с данными клинического состояния животных, наличием признаков заболевания печени, легких или других органов — ценные диагностические тесты.

Сулемовая проба. Принцип. Сулема в присутствии мелкодисперсных коллоидов (белков) образует коллоидный раствор солей ртути. Нарушение дисперсности белковых фракций сыворотки крови вызывает осаждение грубодисперсных частиц.

Реактивы: при исследовании сыворотки крови крупного рогатого скота 100 мг двухлористой ртути растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл (100 мг%-ный). При исследовании сыворотки крови кур и лошадей берут 600 мг сулемы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл (600 мг%-ный);

натрия хлорид, 154 ммоль/л (0,9%-ный). 9 г соли растворяют дистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 1 л.

Оборудование: микробюретка на 2 или 5 мл с оттянутым носиком; стаканчики на 50 мл.

Ход определения. В стаканчик вносят 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и 0,5 мл сыворотки крови, перемешивают. Из микробюретки (или пипетки) медленно, по каплям с интервалом 20—30 с титруют до стойкого помутнения, при котором через вертикальный слой жидкости нельзя прочитать газетный текст. Результат выражают в мл раствора сулемы, пошедшего на титрование.

Источник: 43.

Примечание. Концентрация раствора сулемы для сыворотки крови крупного рогатого скота, лошадей и кур нами (И. П. Кондрахин) подобрана опытным путем.

Клиническое значение. В норме показатель сулемовой пробы у взрослого крупного рогатого скота 1,6—2,6 мл 100 мг% раствора сулемы, у кур и лошадей 1,6—2,6 мл 600 мг% раствора сулемы. При гепатите, циррозе печени, гепатодистрофии показатель сулемовой пробы ниже 1,6 мл, доходит до 0,9—0,7 мл. Чем тяжелее процесс в печени, тем выраженнее диспротеинемия, тем меньше показатель сулемовой пробы. Высокий показатель сулемовой пробы указывает на нарушение коллоидной устойчивости белков сыворотки крови. Такое явление отмечается при снижении содержания общего белка в сыворотке крови. Между уровнем общего белка в сыворотке крови и показателем сулемовой пробы нами установлена отрицательная корреляция, т. е., чем больше белка в сыворотке крови, тем меньше показатель сулемовой пробы. Но эта связь не сильно выражена, бывают случаи, когда при невысокой концентрации общего белка в сыворотке крови сулемовая проба оказывается положительной.

Цинк-сульфатные осадочные пробы. Применение сулемы (ртуть двухлористая, HgCl) в лабораторной практике крайне ограничено в связи с трудностями ее приобретения и особым режимом хранения. Поэтому нами (И. П. Кондрахин) разработаны осадочные

пробы с использованием цинка сульфата. Цинка сульфат при строго определенной концентрации вызывает преципитацию белков сыворотки крови подобно 0,1%-ному раствору сулемы. Оптимальную концентрацию растворов цинка сульфата подбирали опытным путем. В настоящее время предложена и апробирована печеночная осадочная проба и бронхолегочный тест с цинка сульфатом для исследования сыворотки взрослого крупного рогатого скота, свиней, кур-несушек, лошадей.

Цинк-сульфатная осадочная печеночная проба (по И. П. Кондрахину). Принцип. Цинка сульфат вызывает преципитацию белков сыворотки крови и ее помутнение. Скорость этого процесса зависит от содержания в ней альбуминов и глобулинов, а также патологических белков — парапротеинов: чем меньше альбуминов и больше глобулинов или парапротеинов, тем быстрее происходит коагуляция белков и помутнение сыворотки крови.

Реактивы: цинка сульфат 7-водный ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч. д. а. или х. ч.): а) при исследовании сыворотки крови взрослого крупного рогатого скота готовят 55 мг%-ный (1,91 ммоль/л) раствор цинка сульфата: 55 мг вещества растворяют водой в мерной колбе вместимостью 100 мл; б) при исследовании сыворотки крови свиней готовят 100 мг%-ный (3,484 ммоль/л) раствор цинка сульфата; в) при исследовании сыворотки крови кур-несушек — 110 мг%; г) при исследовании сыворотки крови лошадей готовят 125 мг%-ный (4,355 ммоль/л) раствор: 125 мг цинка сульфата растворяют водой в мерной колбе вместимостью 100 мл;

натрия хлорид (NaCl, ч. д. а., х. ч.) 0,9%-ный (154 ммоль/л). 9 г натрия хлорида растворяют водой в мерной колбе вместимостью 1000 мл.

Оборудование: стаканчики вместимостью 50 мл; микробюретки на 2 или 5 мл с оттянутым носиком; пипетки; мерные колбы.

Ход определения. В стаканчик вносят 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида и 0,5 мл сыворотки крови, смешивают и медленно титруют по каплям 55 мг%-ным (1,91 ммоль/л) или 100 мг%-ным (3,484 ммоль/л), или 125 мг%-ным раствором сульфата цинка до тех пор, пока через вертикальный слой жидкости нельзя будет прочитать газетный шрифт. Нормальные величины в том и другом случаях — 1,6—2,6 мл. Показатель ниже 1,6 мл свидетельствует о нарушении белковосинтезирующей функции печени.

Цинк-сульфатный бронхолегочный тест (цинк-сульфатная осадочная проба) по И. П. Кондрахину. Для диагностики бронхопневмонии (пневмонии) в ветеринарии преимущественно используют осмотр, аускультацию, перкуссию, которые не позволяют объективно оценивать тяжесть заболевания. В связи с этим нами разработан бронхолегочный тест с использованием цинка сульфата, позволяющий проводить своевременную диагностику, определять стадию

воспалительного процесса в легких, тяжесть заболевания, оценивать эффективность лечения и прогнозировать течение болезни.

Принцип. Метод основан на выявлении диспротеинемии (гиперглобинемии и гипоальбуминемии), которая присуща пневмонии, бронхопневмонии. Это достигается добавлением к сыворотке крови раствора цинка сульфата, вызывающего ее преципитацию и помутнение. Чем тяжелее воспалительный процесс в легких, тем больше выражена диспротеинемия и тем быстрее идут преципитация и помутнение сыворотки крови.

Реактивы: цинка сульфат 7-водный ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, ч. д. а. или х. ч.), 75 мг%-ный (2,613 ммоль/л) раствор цинка сульфата. 750 мг вещества растворяют в воде в мерной колбе на 1000 мл. Раствор стабилен в течение 2 мес;

натрия хлорид (NaCl, ч. д. а. или х. ч.), 0,9 %-ный (154 ммоль/л) раствор натрия хлорида. 9 г вещества растворяют в воде в мерной колбе на 1000 мл.

Оборудование: стеклянные стаканчики на 50 мл; микробюретка с оттянутым носиком на 5 мл; пипетки; мерные колбы.

Подготовка образцов крови к анализу. Кровь у телят берут из яремной вены в сухие х. ч. пробирки, соблюдая правила асептики и антисептики. Чтобы избежать гемолиза, кровь в пробирки набирают по стенке.

В лабораторию образцы крови доставляют в день взятия. Для получения сыворотки пробирку с кровью обводят тонкой спицей из нержавеющей стали и ставят в термостат при температуре 37—38 °С на 1—2 ч или оставляют при комнатной температуре для окончательного отделения сыворотки. Сыворотку сливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 15 мин при 3000 $мин^{-1}$. Для исследования пригодна сыворотка без гемолиза. Анализ проводят в течение первых двух дней после взятия образцов крови.

Ход определения. В стаканчик вносят поочередно 1 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида, 0,5 мл сыворотки крови, перемешивают. Из микробюретки медленно по каплям с интервалом 1—3 с в стаканчик добавляют 75 мг%-ный раствор цинка сульфата до помутнения содержимого, когда через вертикальный слой жидкости нельзя прочесть газетный текст. Записывают результат.

Клиническое значение. Воспаление легких сопровождается повышением содержания в сыворотке крови глобулинов и снижением количества альбуминов. Чем тяжелее воспалительный процесс, тем сильнее выражена диспротеинемия, тем меньше пойдет раствора цинка сульфата для осаждения грубодисперсных белков — глобулинов.

У клинически здоровых телят в возрасте 1—3 мес величина бронхолегочного теста составляет 1,7—2,7 мл, при легкой и средней тяжести бронхопневмонии — 1,5—1,3, при тяжелом затяжном течении болезни — 1,2 мл и менее. При показателе легочного теста 0,9—0,8 мл и менее прогноз болезни, по нашим наблюдениям, не-

благоприятный. Повышение показателя бронхолегочного теста свидетельствует о положительном лечебном эффекте (выздоровлении животного), снижение — об неэффективности лечения, усугублении патологического процесса. В случаях, когда патологический процесс в легких существенно не изменяется, показатель бронхолегочного теста остается на прежнем уровне.

Источник: 35.

3.3.5. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния углеводного обмена определяют содержание в крови глюкозы, молочной и пировиноградной кислот, в клетках крови и печени-гликогена и других веществ. В сочетании с другими клиническими и лабораторными показателями они имеют определенное диагностическое значение. Применяют методы нагрузки галактозой, пробы с инсулином, адреналином и т. д.

Определение глюкозы в крови, моче по цветной реакции с орто-толуидином. Принцип. Глюкоза при нагревании с орто-толуидином в растворе уксусной кислоты дает окрашенное соединение, интенсивность окрашивания которого пропорциональна концентрации глюкозы. Анализ проводят не позднее 24—48 ч.

Реактивы: орто-толуидин ($CH_3C_6H_4NH_2$, ч.), обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при температуре 200 °С (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 темного стекла без доступа воздуха;

ледяная уксусная кислота (х. ч.);

20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

тиомочевина (ч. д. а.);

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

орто-толуидиновый реактив. В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл орто-толуидина. Реактив стоек при хранении в холодильнике;

калибровочный раствор глюкозы для ее определения в крови жвачных животных 500 мг/л (2,777 ммоль/л) и у моногастричных животных 1000 мг/л (5,555 ммоль/л). 500 мг или 1000 мг глюкозы, высушенной до постоянной массы, растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 мл в 0,2%-ном растворе бензойной кислоты или в воде. Экстинкция калибровочного раствора не должна давать резких колебаний, в противном случае необходимо готовить новый раствор. Хранят калибровочный раствор в холодильнике.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; колба-реторта; песочная баня; водяная баня; термос на 3—5 л; пробирки центрифужные.

Ход определения. *Подготовка безбелкового фильтрата крови.* В центрифужную пробирку вносят 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, 5 мл цельной крови и перемешивают. Готовят все на месте в момент взятия крови у животных. Пробирки помещают в термос со льдом, доставляют в лабораторию, где пробирки помещают в центрифугу на 20—30 мин при 3000 мин$^{-1}$. Верхний слой (безбелковый фильтрат) сливают в другую пробирку и в нем определяют глюкозу. (Можно, кроме того, определять неорганический фосфор и магний.) Хранят безбелковый фильтрат крови в холодильнике не более 5 дней.

Проведение анализа. В пробирку вносят 0,2 мл безбелкового фильтрата крови, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива. Пробирку помещают в кипящую водяную баню на 8 мин (точно). Вода должна непременно кипеть. После чего сразу охлаждают до комнатной температуры под водопроводной водой. Фотометрируют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля при длине волны 580—650 нм (оранжевый или красный светофильтр).

Контроль. 0,4 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, 0,6 мл дистиллированной воды, 9,0 мл орто-толуидинового реактива (на две кюветы). Параллельно готовят калибровочную пробу.

Калибровочную пробу ставят так же, как опытную, но вместо безбелкового фильтрата крови берут 0,1 мл раствора глюкозы с концентрацией 50 или 100 мг%, 0,1 мл 20 %-ного раствора ТХУ, 0,3 мл дистиллированной воды и 4,5 мл орто-толуидинового реактива.

Расчет ведут по формуле

$$C_{оп} = \frac{E_{оп}}{E_к} \cdot 50 \text{ (или } 100),$$

где $C_{оп}$ — концентрация глюкозы в пробе, мг%; $E_{оп}$ — оптическая плотность пробы; $E_к$ — оптическая плотность калибровочного раствора; 50 (или 100) — коэффициент для пересчета в мг% (калибровочный раствор содержит 50 или 100 мг% глюкозы).

Для выражения глюкозы в ммоль/л коэффициентом при 50 мг%-ном растворе будет 2,777, а при 100 мг%-ном — 5,555. При переводе мг% в ммоль/л полученную величину умножают на 0,0555.

Определение глюкозы в моче. После проведения качественной пробы на содержание глюкозы в моче в зависимости от характера реакции разводят мочу в 2—10 раз. 0,1 мл разведенной мочи смешивают с 4,5 мл орто-толуидинового реактива и далее обрабатывают и измеряют, как указано для крови. При расчете результатов соответственно надо учитывать разведение мочи.

Примечания. 1. Построение калибровочного графика не рекомендуется, так как интенсивность окраски проб зависит от условий опыта. Поэтому правильнее обрабатывать калибровочные пробы одновремен-

но с опытными и вести расчет по приведенной выше формуле. 2. При исследовании крови свиней и лошадей целесообразно готовить стандартный раствор с содержанием 100 мг% глюкозы. В этом случае коэффициент для пересчета будет не 50, а 100. 3. Для снижения скорости гликолиза целесообразно кроме антикоагулянта добавлять фтористый натрий в количестве 2,5 мг/мл. В этом случае осаждение крови ТХУ не требуется и для анализа берут 0,1 мл стабилизированной цельной крови.

Источник: 52.

Изложенный метод определения глюкозы в биологических жидкостях по цветной реакции с орто-толуидином положен в основу наборов реактивов, реализуемых различными фирмами. В частности, в состав набора реактивов фирмы ЧНПТ «Филист диагностика» (Украина, Днепропетровск) входит раствор трихлоруксусной кислоты (30 %); орто-толуидиновый реактив (орто-толуидин, тиомочевина, уксусная кислота); калибровочный раствор глюкозы (5000 мг/л, 27,75 ммоль/л). К наборам заводского приготовления прилагаются соответствующие инструкции.

Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по Сомоджи. Принцип. Метод основан на окислении глюкозы в щелочной среде при кипячении с меди сульфатом. При йодометрическом определении образовавшаяся закись меди окисляется йодом. Последний освобождается подкислением определенного количества йодноватисто-кислого калия и калия йодид, а оставшийся свободный йод оттитровывается гипосульфитом.

Реактивы: 5 %-ный раствор цинка сульфата. 5 г цинка сульфата 7-водного растворяют в 95 мл дистиллированной воды;

0,3 моль/л раствор натрия гидроксида. 12 г натрия гидроксида (ч. д. а. или х. ч.) растворяют в 700 мл дистиллированной воды, охлаждают и доводят водой до 1 л. Первый и второй реактивы должны нейтрализовать друг друга. Последнее проверяют медленным титрованием с индикатором фенолфталеином;

реактив Сомоджи: меди сульфат 5-водный (ч. д. а., х. ч.) 8 г; натрия карбонат безводный (ч. д. а., х. ч.) 30 г; калий-натрий винно-кислый 4-водный (сегнетова соль) (ч. д. а.) 30 г; калия йодид (ч. д. а., х. ч.) 5 г; натрия сульфат безводный (ч. д. а., х. ч.) 180 г; раствор 1 моль/л натрия гидроксида (х. ч.) 40 мл; калий йодноватистокислый 1 моль/л раствор (35,67 г KIO_3, ч. д. а., х. ч. на 1 л) 5—10 мл.

Приготовление реактива. Натрид карбонат и сегнетову соль растворяют в 200 мл горячей воды, добавляют раствор натрия гидроксида и меди сульфат, перемешивают, после чего кипятят для удаления CO_2. Натрид сульфат растворяют в 500 мл горячей дистиллированной воды и нагревают до кипения. Оба рас-

твора смешивают и добавляют калий йодистый, предварительно растворенный в малом объеме воды. Затем вливают раствор калия йодноватистокислого и после охлаждения доливают водой в мерной колбе до 1 л. Через несколько дней раствор фильтруют. Реактив рекомендуется держать при комнатной температуре в склянке из темного стекла. Перед употреблением его необходимо немного подогреть и растворить осадок. Приготовленный реактив титруют 0,005 н. раствором гипосульфита. На 1 мл реактива Сомоджи должно пойти 1 мл 0,005 н. раствора гипосульфита. Титр раствора Сомоджи доводят раствором калия йодноватистокислого 1 моль/л;

2 н. (1 моль/л) раствор серной кислоты. 56 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) доводят водой в мерной колбе до 1 л;

0,005 н. раствор натрия тиосульфита (гипосульфита) 5-водного. Готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из стандарт-титра (фиксанала);

1%-ный раствор крахмала, приготовленного в насыщенном растворе натрия хлорида;

1%-ный спиртовый раствор фенолфталеина;

натрий фторид.

Оборудование: сахарные пробирки; водяная баня; микробюретки на 5 мл; колбы из термостойкого стекла на 500 и 1000 мл; термос на 3—5 л.

Ход определения. Для исследования используют цельную гепаринизированную кровь, стабилизированную фтористым натрием из расчета 5—10 мг/мл. Кровь необходимо по возможности быстрее доставить в лабораторию в термосе со льдом, где получают безбелковый фильтрат: к 1 части крови добавляют 5 частей дистиллированной воды, 2 части 0,3 моль/л раствора натрия гидроксида и 2 части 5%-ного раствора цинка сульфата (например, 5 мл крови + 25 мл воды + 10 мл раствора натрия гидроксида + 10 мл 5 %-ного раствора цинка сульфата). Тщательно перемешивают и через 30 мин фильтруют или центрифугируют при 3000 $мин^{-1}$ в течение 10 мин. Фильтрат (центрифугат) сливают в пробирку и закрывают пробкой. Хранить можно в холодильнике не более 2—3 дней. Этот фильтрат можно использовать для определения кетоновых тел.

В пробирку вносят 5 мл прозрачного фильтрата (центрифугата) крови, 5 мл реактива Сомоджи, тщательно перемешивают и помещают на 15 мин (точно) в кипящую водяную баню. Охлаждают до комнатной температуры. После охлаждения содержимое пробирки подкисляют 2,5—3,0 мл 2 н. раствора серной кислоты. Чтобы подкисление пробы произошло одновременно, рекомендуется добавлять кислоту быстро, встряхивая пробирку. Затем в пробирку вносят 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала, перемешивают. Титруют из микробюретки 0,005 н. раствором гипосульфита до

исчезновения синей окраски. Контроль делают как опыт, но вместо фильтрата крови берут 5 мл дистиллированной воды.

Расчет ведут по формуле

$$x = (A - B) \cdot 30,$$

где x — концентрация глюкозы, мг%; A — количество 0,005 н. раствора гипосульфита, затраченного на титрование контрольной пробы, мл; B — количество 0,005 н. раствора гипосульфита, затраченного на титрование опытной пробы, мл; 30 — коэффициент для пересчета в мг%.

При пересчете мг% в ммоль/л полученную величину умножают на 0,0555. Ошибка метода составляет ±5 %.

Источник: 52.

Клиническое значение. Глюкоза — главный источник энергии для клеток организма. На ее долю приходится более 90 % всех низкомолекулярных углеводов.

Относительно постоянный уровень глюкозы в крови поддерживается благодаря сахароснижающему свойству инсулина и сахароповышающему свойству адреналина, глюкогона и глюкокортикоидов.

Концентрация глюкозы в венозной крови на 10 % меньше, чем в капиллярной, она быстро снижается благодаря гликолизу. Поэтому глюкозу в крови определяют сразу после ее взятия или проводят осаждение белков трихлоруксусной кислотой непосредственно на ферме или добавляют ингибитор.

Нормативы глюкозы в крови животных приведены в приложениях 4—7.

Снижение сахара в крови (гипогликемия) бывает при кетозе, вторичной остеодистрофии, послеродовом парезе, некоторых формах ожирения, токсических поражениях печени. Часто оно следствие недостатка в кормах легкоусвояемых углеводов, большой потребности в глюкозе при высококонцентратном типе кормления, преобладании в рационах кислых кормов. К гипогликемии приводят передозировки инсулина.

Повышение сахара в крови (гипергликемия) может быть стойким и непродолжительным — при скармливании скоту больших количеств сахаристых кормов, а также при испуге, высокой температуре, стрессовом состоянии. Стойкая гипергликемия бывает при сахарном диабете. Однако следует иметь в виду то обстоятельство, что при сахарном диабете, сопровождаемом выраженной глюкозурией, содержание глюкозы в крови может быть в пределах нормы. Это обусловлено понижением почечного порога (ослабление реабсорбции глюкозы в почечных канальцах).

В моче здоровых животных глюкозу, как правило, не обнаруживают. Появление ее в моче (глюкозурия) бывает при сахарном диабете, когда уровень глюкозы в крови превышает пороговую концентрацию. Почечный порог глюкозы в крови у собак 6,66 ммоль/л.

Почечную глюкозурию отмечают при снижении почечного порога вследствие дистрофии почечных канальцев даже при нор-

мальной концентрации глюкозы в крови. Это так называемый «почечный» диабет.

Определение пировиноградной кислоты по модифицированному методу Фреедмана и Хаугена. Принцип. Пировиноградная кислота при добавлении 2,4-динитрофенилгидрозина превращается в 2,4-динитрофенилгидрозон пировиноградной кислоты, который очищается от примесей гидрозонов и других кетокислот последовательной экстракцией содовым раствором. 2,4-динитрофенилгидрозон образует со щелочью соединение коричнево-красного цвета, интенсивность которого определяют на фотометре.

Реактивы: 7,5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. Готовят небольшое количество, хранят в холодильнике. Старые растворы использовать нецелесообразно;

толуол чистый (перегнанный);

0,1 %-ный раствор 2,4-динитрофенилгидрозина в 2 моль/л растворе соляной кислоты. 100 мг 2,4-динитрофенилгидрозина растворяют в 100 мл 2 моль/л раствора соляной кислоты. Кислоту добавляют небольшими порциями и нагревают на водяной бане до полного растворения 2,4-динитрофенилгидрозина. Раствор фильтруют и хранят в холодильнике в склянке из темного стекла;

10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

10%-ный раствор натрия карбоната;

1,5 моль/л раствор натрия гидроксида;

2 моль/л раствор соляной кислоты;

основной раствор пировиноградной кислоты. 20 мг пировиноградной кислоты или 25 мг натрия пировиноградноки слого растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл;

стандартный 1 мг%-ный раствор пировиноградной кислоты. Готовят перед анализом из основного раствора; 5 мл основного раствора пировиноградной кислоты или натрия пировиноградноки слого в мерной колбе доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Оборудование: ФЭК; химические пробирки с притертой пробкой; водяная баня.

Ход определения. *Осаждение белков крови.* Для получения цельной крови в качестве стабилизатора (антикоагулянта) используют натрия фторид из расчета 100 мг на 10 мл крови. 3 мл только что взятой стабилизированной крови вносят в центрифужную пробирку, затем медленно (по каплям) прибавляют 3 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Пробирку помещают на 10 мин в баню со льдом для лучшего осаждения белка, после чего центрифугируют 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость осторожно сливают в чистую пробирку и используют для определения пировиноградной и молочной кислот. Хранят в банке со льдом.

Образование 2,4-динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. В пробирку с притертой пробкой вносят 1 мл безбелкового

фильтрата крови и помещают в водяную баню при температуре 25 °С на 10 мин. Добавляют 0,25 мл 0,1%-ного раствора 2,4-динитрофенилгидрозина. Пробу выдерживают 10 мин при комнатной температуре (для образования гидрозина пировиноградной кислоты).

Экстракция 2,4-динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. К реакционной смеси добавляют 2 мл толуола, пробирку закрывают пробкой и содержимое ее тщательно встряхивают в течение 3 мин. Пробу на 10 мин оставляют для расслоения жидкости. После этого осторожно с помощью шприца и пипетки удаляют нижний водяной слой. К толуоловому экстракту добавляют 1,5 мл 10%-ного раствора натрия карбоната и хорошо взбалтывают, снова дают разделиться слоям жидкости. На этом этапе гидрозон пировиноградной кислоты переходит в содовый раствор.

Колориметрирование. Из нижнего содового раствора отбирают 1,25 мл, вносят в чистую пробирку, прибавляют 1,25 мл 1,5 моль/л раствора натрия гидроксида. При этом развивается красно-бурая окраска, специфичная для 2,4-динитрофенилгидрозона пировиноградной кислоты. Через 20 мин проводят фотометрирование в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 465 нм (синий светофильтр) против контроля.

Контроль готовят так же, как опытную пробу, только без крови. В качестве контроля может быть использован 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Параллельно проводят обработку калибровочного раствора пировиноградной кислоты или натрия пировиноградокислого, содержащего 1 мг% пировиноградной кислоты, так же, как и пробу крови.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{A}{B} \cdot 1,$$

где x — количество пировиноградной кислоты на 100 мл крови, мг; A — экстинкция опытной пробы; B — экстинкция калибровочной пробы; 1 — содержание пировиноградной кислоты в стандартной пробе, мг%.

При переводе мг% в мкмоль/л полученную величину умножают на 113,6.

Расчет можно проводить по калибровочной кривой, построенной по стандартному раствору пировиноградной кислоты или натрия (лития) пировиноградокислого и содового раствора. Готовят стандартный раствор, содержащий в 1 мл 50 мкг пировиноградной кислоты. Далее берут 7 пробирок и вносят последовательно 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 и 1 мл стандартного раствора. В каждую пробирку добавляют соответственно 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,4 и 0,2 мл дистиллированной воды. Затем добавляют последовательно в том же порядке все реактивы, как и в опытную пробу, проводят колориметрирование и строят калибровочную кривую. Откладывают на оси ординат величину оптической плотности, а на оси абсцисс —

соответствующее ей количество пировиноградной кислоты в мкг в 1 мл (т. е. 5, 10, 15, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл).

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Пировиноградная кислота — промежуточный продукт углеводного и белкового обменов. Она тесно связана с обменом тиамина. Тиамин в форме тиаминдифосфата является коферментом декарбоксилаз, участвующих в окислительном декарбоксилировании пировиноградной кислоты. При недостатке тиамина в крови и моче повышается концентрация пировиноградной кислоты со всеми последующими патологическими явлениями. Нормальное содержание пировиноградной кислоты в крови колеблется от 0,6 до 1,7 мг%, или от 68 до 193 мкмоль/л (см. приложение 5). Ее содержание в крови повышается при гиповитаминозе B_1, нарушении окислительно-восстановительных процессов в условиях дефицита кислорода, болезнях печени, кетозе и т. д.

Источник: 48.

Определение молочной кислоты по реакции с параоксидифенилом. П р и н ц и п. Из молочной кислоты в присутствии серной, фосфорной кислот и солей меди образуется уксусный альдегид, который, реагируя с параоксидифенилом ($C_6H_5C_6H_4OH$), дает фиолетово-окрашенные продукты. Реакция очень чувствительная, поэтому нужно строго выдерживать все условия выполнения исследования. В пробирку для взятия крови добавляют смесь ЭДТА и натрия фторида. Кровь немедленно охлаждают. Анализ проводят быстро.

Р е а к т и в ы: концентрированная серная кислота, выдерживающая пробу Саваля (х. ч., плотность 1,84), от ее качества зависит возможность выполнения анализа, иногда качество кислоты можно улучшить, нагревая ее и по каплям добавляя в нагретую кислоту пероксид водорода;

смесь из 3 г меди сульфата ($CaSO_4 \cdot 5H_2O$, ч. д. а., х. ч.) и 9 мл ортофосфорной кислоты (H_3PO_4, ч. д. а., х. ч.), через некоторое время должен образоваться гомогенный раствор;

1,5 %-ный раствор параоксидифенила ($C_6H_5C_6H_4OH$) в диметилформамиде. Растворяют 15 мг параоксидифенила в 1 мл диметилформамиде;

5 %-ная трихлоруксусная кислота (0,3 н.).

Х о д о п р е д е л е н и я. 0,02 мл крови вносят в 1 мл 5 %-ной трихлоруксусной кислоты. Через несколько минут центрифугируют 15 мин при 3000 $мин^{-1}$. К 0,2 мл центрифугата прибавляют 0,1 мл смеси медного купороса и ортофосфорной (фосфорной) кислоты и 2,5 мл концентрированной серной кислоты. Энергично встряхивают и точно через 3 мин ставят ровно на 3 мин в кипящую водяную баню, затем еще 3 мин охлаждают в ледяной воде. Добавляют 1 каплю раствора параоксидифенила в диметилформамиде, капля должна сразу попасть в центр пробирки. Встряхивают и оставляют стоять 10 мин при комнатной температуре. После этого нагревают на кипящей водяной бане 1,5 мин, охлаждают в воде и фотометрируют при длине волны 565 нм.

Одновременно ставят холостой опыт, в котором вместо безбелкового фильтрата применяют 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, и калибровочные пробы, в которые берут растворы ТХУ, содержащие в 0,2 мл 2—20 нмоль молочной кислоты или молочнокислого лития. Их обрабатывают так же, как опытные. Окраска калибровочной пробы, в которой взято 2 нмоля молочной кислоты, соответствует пробе с содержанием 0,5 ммоль/л; соответственно окраска пробы, содержащей 20 нмоль, соответствует концентрации 5 ммоль/л.

Источник: 43.

Примечание. Метод определения молочной кислоты по Баркеру и Саммерсону изложен в книге «Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии»: Справочник / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. — М.: Агропромиздат, 1985. — С. 88—90.

Клиническое значение. Молочная кислота образуется при распаде гликогена и глюкозы, ее источником также служит пируват. В норме содержание молочной кислоты у животных колеблется в пределах 0,295—0,760 ммоль/л (см. приложение 5).

Повышение содержания молочной кислоты (гиперлактатемия) отмечается при ацидозе рубца, поедании животными большого количества свеклы, зеленой массы кукурузы молочно-восковой спелости, зерновых злаковых, содержащих много крахмала. Бывает при миоглобинурии, диабете, эндемической остеодистрофии бычков, интенсивном их выращивании и откорме, когда болезнь сопровождается ацидозом рубца и всасыванием в кровь большого количества молочной кислоты. Повышение концентрации лактата в крови может быть обусловлено поражением печени, кислородной недостаточностью (гипоксия), чрезмерной физической нагрузкой, местным нарушением кровообращения.

Метод неферментативного определения лактата и пирувата в одной пробе крови. Принцип. В основу метода определения лактата положена способность молочной кислоты превращаться в ацетоальдегид, который дает с гидрохиноном красно-коричневое окрашивание. В щелочной среде пируват с п-диметиламинбензальдегида (п-ДБА) образует комплекс желтого цвета.

Условия взятия образца крови, хранения и исследования такие же, как и при определении лактата.

Реактивы: 10%-ный раствор H_2PO_3. Хранят не более 3 дней;

25%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;

10%-ный раствор $CuSO_4 \cdot 5H_2O$;

$Ca(OH)_2$ в порошке (ч. д. а.);

концентрированная H_2SO_4;

20%-ный спиртовой раствор гидрохинона;

раствор п-диметиламинбензальдегида (п-ДБА): 500 г п-ДБА в 60 мл метилсульфоксида, дистиллированная вода до 100 мл;

25%-ный раствор NaOH.

Оборудование: водяные бани на 37 °С и 100 °С; центрифуга ОПН-8; спектрофотометр СФ-46; центрифужные пробирки; пробирки с притертыми пробками; пипетки.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 6 мл дистиллированной воды и 1 мл взятой крови, 1 мл 10%-ного раствора H_2PO_3, хорошо встряхивают и оставляют на 2 мин для осаждения белков. Центрифугируют 5 мин при 2000—3000 мин$^{-1}$. Прозрачную надосадочную жидкость переносят в чистую центрифужную пробирку, приливают 1 мл 25%-ного раствора $CuSO_4$ и вносят 0,5 г $Ca(OH)_2$, тонко растертого до порошка. Стеклянной палочкой перемешивают пробы, пока голубая окраска не перейдет в синюю. Через 30 мин центрифугируют пробу 10 мин при 2000—3000 мин$^{-1}$. Полученный безбелковый центрифугат переносят в градуированную пробирку для определения коэффициента K измерения объема анализируемого раствора:

$$K = V/v,$$

где V — общий объем анализируемого раствора (кровь, вода, осадители белков и углеводов), мл; v — объем безбелкового и безуглеводного центрифугата, мл.

Для определения пирувата (Р) в центрифужную пробирку вносят 1 мл анализируемого раствора (в контроль — 1 мл воды), 3 мл реактива п-ДБА и 1 мл 25%-ного раствора NaOH. Тщательно перемешивают реакционную смесь и помещают в водяную баню при 37 °С на 45 мин.

Во время термостатирования смеси с пируватом параллельно определяют содержание лактата. Для этого в центрифужную пробирку с притертой пробкой вносят 1 мл прозрачного центрифугата (в контроль — 1 мл воды), добавляют по 0,1 мл 10%-ного раствора $CuSO_4$ и осторожно по стенке приливают по 4 мл концентрированной H_2SO_4, хорошо закрывают пробкой во избежание испарения образовавшегося в результате реакции ацетальдегида. Смесь помещают в кипящую водяную баню на 1,5 мин. После кипячения и охлаждения вносят 0,1 мл спиртового раствора гидрохинона, перемешивают, повторно помещают в кипящую водяную баню на 15 мин и охлаждают. Охлажденный раствор колориметрируют при длине волны 430 нм против контроля. Содержание лактата рассчитывают по калибровочной кривой с учетом коэффициента K (рис. 2).

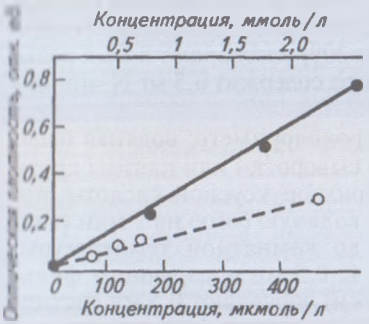


Рис. 2. Калибровочные кривые для определения лактата и пирувата:
По оси абсцисс — концентрация (ммоль/л) лактата (сплошная линия), концентрация (мкмоль/л) пирувата (пунктирная линия); *по оси ординат* — оптическая плотность, относительные единицы

По истечении 45 мин термостатирования реакционную смесь с пируватом центрифугируют при 2000—3000 мин$^{-1}$ и осторожно переносят надосадочную жидкость в спектрофотометрические кюветы для определения оптической плотности анализируемого раствора (при 420 нм) против контроля. Концентрацию пирувата рассчитывают по калибровочной кривой с учетом коэффициента *К*.

Для построения калибровочных графиков используют растворы лактата и пирувата с разведением 1 : 8, обрабатывая их аналогично центрифугату. Концентрацию лактата и пирувата в крови рассчитывают путем умножения величин, полученных по калибровочным кривым, на коэффициент *К*.

Источники: 8, 16, 33.

Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по реакции с резорцином. Принцип. При добавлении трихлоруксусной кислоты к сыворотке крови и нагревании происходит мягкий гидролиз гликопротеидов с отщеплением нейроминовой кислоты, которая затем вступает в реакцию с раствором резорцина в соляной кислоте с образованием хромогена синего цвета.

Реактивы: резорциновый реактив. Реактив готовят в мерной колбе на 100 мл. 200 мг резорцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды, добавляют 80 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и 0,25 мл 0,1 моль/л раствора меди сульфата, смешивают, объем доводят дистиллированной водой до 100 мл. Реактив можно использовать через 4 ч после приготовления. Годен в течение 1 мес при хранении в холодильнике;

реактив для экстракции. 85 мл бутилацетата смешивают с 15 мл бутилового спирта;

5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

основной калибровочный раствор. 50 мг%-ный водный раствор N-ацетилнейраминовой кислоты. 0,5 мг кристаллической N-ацетилнейраминовой кислоты (мол. масса 309) растворяют в 1 мл воды. 1 мл основного калибровочного раствора содержит 0,5 мг N-ацетилнейраминовой кислоты.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня.

Ход определения. К 0,1 мл сыворотки или плазмы крови добавляют 1,9 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 7 мин (точно). Охлаждают в проточной воде до комнатной температуры, фильтруют через бумажный фильтр. К 0,5 мл прозрачного фильтрата (соответствует 0,025 мл сыворотки) добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. В каждую пробирку вносят по 1 мл резорцинового реактива, закрывают стеклянными пробками и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню (пробирки закрывают пробками для уменьшения испарения), охлаждают проточной водой, добавляют по 3 мл раствора для экстракции, встряхивают, оставляют на 15 мин для расслоения фаз. Верхний окрашенный слой отсасыва-

ют и измеряют на ФЭКе при длине волны 575—590 нм (желтый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против контроля.

Контроль. К 1 мл дистиллированной воды прибавляют 1 мл резорцинового реактива, помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, охлаждают в проточной воде до комнатной температуры, добавляют 3 мл раствора для экстракции, встряхивают, отсасывают верхний слой, который используют в качестве контроля.

Для построения калибровочного графика готовят разведения (рабочий раствор) из основного калибровочного раствора N-ацетилнейраминовой кислоты (табл. 19).

19. Разведения для построения калибровочного графика

Основной раствор *N*-ацетилнейраминовой кислоты, мл	Вода, мл	Содержание в 1 мл		Концентрация в плазме	
		мкг	ммоль	мг/л	ммоль/л
0,1	0,9	50	162	200	0,65
0,2	0,8	100	324	400	1,29
0,3	0,7	150	485	600	1,94
0,4	0,6	200	647	800	2,59
0,5	0,5	250	809	1000	3,24

Из каждого рабочего калибровочного раствора с указанной концентрацией берут по 1 мл, добавляют по 1 мл резорцинового реактива и далее обрабатывают так же, как опытные пробы. Расчет ведут по калибровочному графику.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Сиаловые кислоты являются N-ацетильными производными нейраминовой кислоты, играющей важную роль в качестве строительных блоков структурных полисахаридов. Нейраминовая кислота представляет собой производное девятиуглеродной сахарной кислоты. Ее можно рассматривать как продукт присоединения шестиуглеродного аминосахара к трехуглеродной сахарной кислоте. Нейраминовая кислота и ее производные — сиаловые кислоты в свободном состоянии присутствуют в крови, ликворе, слюне и других биологических субстратах.

Содержание нейраминовых кислот в сыворотке крови резко возрастает при многих инфекционных заболеваниях, раковых опухолях, лейкозах, дистрофических и воспалительных процессах в почках (нефроз, нефрит) и печени (гепатоз), а также при поражении соединительной ткани (коллагенозы) и сердечной мышцы.

Источник: 43.

Определение кетоновых тел в крови йодометрическим методом. П р и н ц и п. Из безбелкового фильтрата перегоняют свободный ацетон и ацетон, образовавшийся из ацетоуксусной и β-оксимасляной кислот, прибавлением хромовой смеси и кипячением. В дистилляте определяют весь перегнанный ацетон, связывая его прибавлением йода и щелочи. Ацетон с йодом в щелочной среде об-

разует йодоформ и натрия йодид. Избыток йода освобождают прибавлением серной кислоты и определяют при помощи титрования раствором натрия тиосульфата. По разности между контролем и опытом определяют связанный йод.

Р е а к т и в ы: 0,3 моль/л раствор натрия гидроксида;

5%-ный раствор цинка сульфата ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$);

бихроматная смесь: 20 г двухромовокислого калия, 200 мл концентрированной серной кислоты, дистиллированная вода до 1 л. В мерную колбу на 1 л вливают 400—600 мл дистиллированной воды, осторожно приливают 200 мл серной кислоты и, постоянно помешивая, 20 г мелкоистолченного калия двухромовокислого. После растворения вещества и остывания реактива доливают водой до метки;

20%-ный раствор серной кислоты (по объему);

10%-ный раствор натрия гидроксида;

001 н. (0,005 моль/л) раствор йода. Готовят перед анализом из 0,1 н. раствора, приготовленного из фиксанала. Титр 0,01 н. раствора йода каждый раз проверяют по 0,01 н. (0,01 моль/л) раствору натрия тиосульфата (натрия серноватистокислого 5-водного, $Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$);

0,01 моль/л раствор натрия тиосульфата. Готовят из стандарт-титра последовательно, вначале 0,1 моль/л, а затем 0,01 моль/л;

1%-ный раствор крахмала. Готовят заранее насыщенный раствор натрия хлорида, наливают его в мерную колбу вместимостью 100 мл больше чем до половины, 1 г растворимого крахмала растворяют в пробирке в нескольких миллилитрах дистиллированной воды при нагревании, выливают в ту же колбу и доливают раствором натрия хлорида до метки. Раствор стоек, с йодом должен давать чисто-синее окрашивание.

О б о р у д о в а н и е: приборы (перегонный аппарат, рис. 3) для определения кетоновых тел (20—30 шт.), монтируют в вытяжном шкафу; электроплитки (8—10 шт.); микробюретки на 2 и 5 мл; стаканчики химические на 75—100 мл.

Х о д о п р е д е л е н и я. *Приготовление безбелкового фильтрата по Сомоджи.* К 5 мл крови добавляют 25 мл дистиллированной воды, 10 мл 0,3 моль/л раствора натрия гидроксида, перемешивают, добавляют 10 мл 5%-ного раствора цинка сульфата, все тщательно взбалтывают и через 10 мин фильтруют через бумажный фильтр. Таким образом получим разведение крови 1 : 10.

Определение общего количества кетоновых тел. Непосредственно перед работой включают холодильник и аппарат просасывают 20 мин текучим паром, налив в перегонную колбу дистиллированную воду и добавив в нее немного пемзы для равномерного кипения.

В приемный стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 н. (0,005 моль/л) раствора йода, 2 мл 10%-ного раствора натрия гидроксида и ставят под холодильник перегонного аппарата так, чтобы конец его погрузился в жидкость. В перегонную кол-

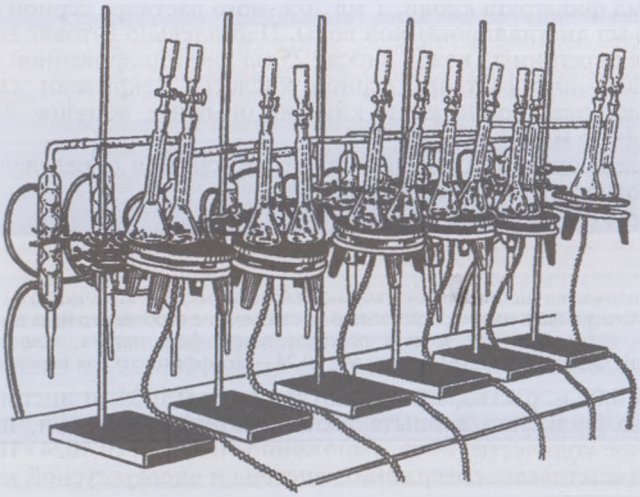


Рис. 3. Перегонный аппарат для определения кетоновых тел

бу вносят 10 мл фильтрата крови, 15 мл бихроматной смеси и 10 мл дистиллированной воды.

Параллельно готовят контроль в двух аппаратах: в перегонную колбу вносят 20 мл дистиллированной воды и 15 мл бихроматной смеси. Приборы закрывают, соединяют холодильники с водопроводом, пускают воду и включают электроплитки. Опытные образцы кипятят 25 мин, контрольные — 15 мин. Затем отключают нагрев, снимают перегонную колбу, холодильник смывают небольшим количеством дистиллированной воды. Приемный стаканчик закрывают крышкой и ставят в темное место на 15—20 мин. По истечении указанного времени в приемный стаканчик быстро приливают 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты, добавляют 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала и титруют 0,01 моль/л раствором натрия тиосульфата до обесцвечивания.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = (A - B) \cdot 0{,}25 \cdot 100,$$

где x — количество кетоновых тел, мг%; A — количество 0,01 моль/л раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование свободного йода в контрольной пробе, мл; B — количество 0,01 моль/л раствора натрия тиосульфата, пошедшего на титрование свободного йода в опытной пробе, мл; 1 мл 0,01 моль/л раствора йода связывает в данных условиях 0,25 мг ацетона; 100 — коэффициент перевода в мг%.

Определение ацетона и ацетоуксусной кислоты. В приемный стаканчик вносят 20 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,01 моль/л раствора йода, 2 мл 10%-ного раствора натрия гидроксида и ставят

под холодильник перегонного аппарата. В перегонную колбу вносят 10 мл фильтрата крови, 1 мл 20%-ного раствора серной кислоты и 15 мл дистиллированной воды. Параллельно готовят два контроля: в перегонную колбу вносят 25 мл дистиллированной воды и 1 мл 20%-ного раствора серной кислоты. Закрывают систему, включают электроплитки и кипятят опытные образцы 25 мин, контроль 15 мин.

Последующий ход анализа такой же, как при определении общего количества кетоновых тел.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = (A - B) \cdot 10{,}24,$$

где x — количество ацетона и ацетоуксусной кислоты, мл; A — количество 0,01 моль/л раствора тиосульфата натрия, пошедшего на связывание свободного йода в контроле, мл; B — количество 0,01 моль/л раствора тиосульфата натрия, пошедшего на связывание свободного йода в опыте, мл; 10,24 — коэффициент для перевода в мг%.

1 мл 0,01 н. раствора йода соответствует 0,1024 мг ацетона. Количество фильтрата в опыте соответствует 1 мл крови, поэтому связанное количество йода, умноженное на 10,24 (0,1024 · 100), будет соответствовать содержанию ацетона и ацетоуксусной кислоты в 100 мл крови.

Определение β-оксимасляной кислоты. В приемный стаканчик вносят те же реактивы, что и для определения общего количества кетоновых тел, ставят его под холодильник. Перегонную колбу после отгонки ацетона и ацетоуксусной кислоты охлаждают и вносят в нее 15 мл бихроматной смеси (не сразу, а в два приема). Закрывают систему, подключают электроплитки. Кипение продолжается 20 мин. Необходимо следить, чтобы кипячение в колбе не прекращалось и жидкость не выкипала (не было потемнения бихромата). Если бихромат из воронки весь вылит, а жидкость выкипает, можно частями долить дистиллированную воду. По истечении 28 мин отсоединяют от холодильника приемную колбу, отключают нагрев. Перегонную колбу и холодильник промывают 4—5 мл дистиллированной воды. Приемный стаканчик ставят в темное место на 15 мин.

Контроль. В перегонную колбу вносят 10 мл дистиллированной воды, 15 мл бихромата. Кипятят 25 мин. Титруют 0,01 моль/л раствором натрия тиосульфата, как описано выше.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = (A - B) \cdot 25,$$

где x — количество β-оксимасляной кислоты, мл; A — количество 0,01 моль/л раствора натрия тиосульфата, пошедшего на связывание свободного йода в контроле; B — количество 0,01 моль/л раствора натрия тиосульфата, пошедшего на связывание свободного йода в опыте; 25 — коэффициент для перевода в мг%.

Примечания. 1. В лаборатории, где проводят определение кетоновых тел, должен быть чистый, свежий воздух. В этих условиях количество 0,01 моль/л раствора

натрия тиосульфата, пошедшего на титрование контрольных проб, должно быть только на 0,1 — 0,15 мл меньше, чем было затрачено его при установлении титра 0,01 н. раствора йода, т. е. на 2 мл должно пойти не менее 1,85—1,90 мл. Проверяют чистоту воздуха следующим образом. Рядом с перегонным аппаратом ставят приемный стаканчик, в который внесено 5 мл дистиллированной воды, 2 мл 10%-ного раствора натрия гидроксида и 2 мл 0,01 н. раствора йода. Смеси дают постоять 20—30 мин, после чего приливают 2 мл 20%-ного раствора серной кислоты, 2—3 капли 1%-ного раствора крахмала и титруют 0,01 моль/л раствором натрия тиосульфата. Если в лаборатории воздух чистый, то на титрование пойдет около 1,85—1,90 мл раствора натрия тиосульфата, при его загрязнении — значительно меньше. 2. Определение кетоновых тел в молозиве (молоке) проводят по описанному выше методу. Предварительно готовят безбелковый фильтрат. Молозиво (молоко) обезжиривают центрифугированием при 3000 $мин^{-1}$ в течение 30 мин. Пробу с молозивом (молоком) ставят в морозильную камеру холодильника на 20 мин, после чего осторожно отбирают 5 мл обезжиренной жидкости и определяют в ней кетоновые тела так же, как в крови.

Экспресс-метод обнаружения ацетоновых тел в сыворотке (плазме) крови. При содержании в сыворотке крови ацетона, ацетоуксусной кислоты в концентрации выше 10 мг/100 мл, что бывает при кетозе, их можно обнаружить с использованием специальных тест-пластин или реактива Лестраде, Ланге и др.

Состав реактива Лестраде: натрия нитропруссидного [$Na_2(Fe(NO)(CN)_5 \cdot 2H_2O$] 1 часть, аммония сульфата [$(NH_4)_2SO_4$] 70 частей, натрия карбоната безводного [Na_2CO_3] 20 частей. Компоненты мелко измельчают в фарфоровой ступке в однородный порошок, который помещают в склянку из темного стекла с пробкой. Хранят 1—2 мес.

Ход определения. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля наносят около 50 мг реактива Лестраде и смачивают его 2—3 каплями сыворотки (плазмы) крови. Через 40—60 с читают реакцию. Появление сиреневой окраски свидетельствует о наличии в сыворотке крови более 10 мг/100 мл ацетона и ацетоуксусной кислоты (такова степень чувствительности реактива). Чем интенсивнее окраска, тем больше ацетоновых тел в исследуемой жидкости. Высокая концентрация ацетоновых тел в крови, молоке и моче присуща кетозу.

Клиническое значение. Кетоновые (ацетоновые) тела — группа органических соединений (β-оксимасляная кислота, ацетоуксусная кислота и ацетон) — промежуточные продукты обмена жиров, углеводов и белков. Повышение уровня кетоновых тел в крови, моче, молоке и других биологических субстратах свидетельствует о нарушении углеводного, жирового и других видов обмена.

У здоровых животных содержание кетоновых тел в крови 1—8 мг/100 мл (0,17—1,3 ммоль/л), в молоке 6—8 мг/100 мл (1,03—1,36 ммоль/л), в моче 6—10 мг/100 мл (1,0—1,7 ммоль/л). Содержание ацетоуксусной кислоты и ацетона в крови составляет около 15 %, а β-оксимасляной кислоты — 85 % общего количества кетоновых тел. (Пределы колебаний содержания кетоновых тел в крови здоровых животных см. в приложении 5.)

Характерный признак кетоза у коров и овцематок — гиперкетонемия, гиперкетонурия, гиперкетонолактия.

При кетозе, особенно в начальной острой стадии заболевания, содержание кетоновых тел в крови, молоке и моче резко повышается, главным образом за счет ацетоуксусной кислоты и ацетона. При затяжном течении болезни, потере аппетита и исхудании уровень кетоновых тел в крови падает и нередко не выходит за верхние пределы нормы, в то время как в начальный период болезни превышал ее в несколько раз (И. П. Кондрахин).

Умеренная вторичная кетонемия может быть при задержании последа, эндометрите, травматическом ретикулоперитоните, хирургической инфекции и других септических процессах.

Вторичная кетонемия (кетонурия) носит нестойкий характер и исчезает с устранением основного первичного заболевания. Кетонемию при кетозе устанавливают у многих животных в стаде, вторичная кетонемия встречается у единичных животных.

Источники: 52, 64.

3.3.6. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА

Для оценки состояния липидного обмена в организме животных проводят ряд последовательных и взаимосвязанных операций, включающих следующие этапы: выделение липидов из исследуемых субстратов (сыворотки или плазмы крови, молока, яиц, органов, тканей и т. п.); количественное определение отдельных классов липидов без разделения их на классы или после разделения методом тонкослойной хроматографии (ТСХ); разделение фосфолипидов на подклассы; определение жирнокислотного состава общих липидов или отдельных классов (фосфолипидов, моно-, ди- и триацилглицеринов, неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК), эфиров холестерина и подклассов фосфолипидов (фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и др.) и другие показатели.

В основе выделения липидов лежат такие операции, как экстракция, очистка их от нелипидных компонентов, концентрация и определение суммарного выхода липидов методом взвешивания на аналитических весах. Среди известных в настоящее время методов выделения липидов из биологических материалов в лабораторной практике наиболее распространен метод экстракции хлороформ-метаноловой смесью; реже прибегают к экстракции спиртово-эфирной смесью.

Метод экстракции липидов хлороформ-метаноловой смесью (по Фолчу). Принцип. Метод заключается в разрушении липидно-белковых связей полярными растворителями (в данном случае метанолом), что облегчает последующее экстрагирование липидов неполярными растворителями (хлороформом, диэтиловым или петролейным эфиром). В данном случае полярные и неполярные растворители представлены в виде одной смеси. Метод пригоден для извлечения липидов из любых тканей животного и растительного происхождения. В настоящее время считается универсальным. Обязательное требование данного метода — соблюдение соотношения субстрата и растворителя 1 : 20.

Реактивы: хлороформ. Из хлороформа необходимо удалить фосген, который реагирует с окси- и аминогруппами липидов. Свежий продажный хлороформ достаточно перегнать и хранить в темной бутылке с добавлением 1 % метанола (или этанола), который препятствует образованию фосгена;

метанол освобождают от альдегидов перегонкой над гранулированным калия гидроксидом. Перегнанный метанол хранят в темной бутылке 1—2 мес;

смесь хлороформ-метанола в соотношении 2 : 1 по объему (смесь 1);

смесь растворителей верхней фазы, содержащая минеральные соли (смесь 2): хлороформ-метанол-водный раствор соли в соотношении 3 : 48 : 47 по объему. В качестве солей могут быть использованы KCl (0,75 %), NaCl (0,58 %) или $CaCl_2$ (0,04 %);

антиоксидант бутилокситолуол (БОТ, ионол).

Оборудование: пробирки обычные и с притертыми пробками вместимостью 10, 20 и 50 мл; цилиндры мерные с притертыми пробками вместимостью 25, 50 и 100 мл; конические колбочки с плоским дном обычные и с притертыми пробками на 50 и 100 мл; пипетки с делениями разных объемов; гомогенизатор; водоструйный насос; роторный испаритель; аналитические весы.

Ход определения. В пробирку или колбу наливают необходимое количество смеси 1, из пипетки вносят необходимый объем сыворотки (плазмы) крови или молока (например, 40 мл хлороформ-метаноловой смеси и 2 мл сыворотки в соотношении 1 : 20). Чтобы избежать окисления липидов, к пробам добавляют антиоксидант бутилокситолуол (БОТ), который вносят с метано-

лом в количестве 0,1 % от количества липидов. Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой или покачиванием колбы и оставляют стоять или подогревают на водяной бане при 40—45 °С 2—3 мин, затем фильтруют через обезжиренный бумажный или стеклянный фильтр в мерный цилиндр на 50 мл с притертой пробкой.

Желток яйца вносят в предварительно взвешенную колбочку, взвешивают и заливают смесью 1.

Печень или мышечную ткань отвешивают, помещают в стакан гомогенизатора, добавляют такое же количество физраствора и гомогенизируют 2—3 мин. Затем отвешивают необходимое количество (2—6 г) гомогената в плоскодонную колбочку, заливают 20 частями смеси 1, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, оставляют стоять в течение 1 ч или подогревают на водяной бане в течение 5—10 мин и потом фильтруют в мерный цилиндр.

Для экстракции липидов из кормов или сухих образцов животных тканей их измельчают, заливают смесью 1, колбочки закрывают пробкой и оставляют для экстракции на 18—24 ч (с периодическим перемешиванием) или встряхивают на шуттель-аппарате в течение 1,5—2 ч. Содержимое подогревают при 45—50 °С 5—10 мин и фильтруют.

Для удаления нелипидных соединений из экстракта к последнему добавляют 1/5 объема воды (это соотношение следует строго соблюдать, так как в противном случае расслоение смеси на две фазы не произойдет). Цилиндр закрывают притертой пробкой, энергично встряхивают до образования молокообразной взвеси и оставляют стоять на ночь для расслоения или содержимое переносят в пробирки и центрифугируют.

Верхний водно-спиртовой слой (≈ 40 %), содержащий нелипидные вещества, удаляют микробиологической пипеткой, присоединенной к водоструйному насосу или к шприцу. При этом нельзя затрагивать пограничную (липопротеидную) пленку. Если она содержит много нелипидных соединений (рыхлая, белого цвета), то ее следует отмыть. Для этого по стенке цилиндра пипеткой наслаивают 1—2 мл смеси 2. Цилиндр осторожно поворачивают вокруг своей оси, и смесь отсасывают. При необходимости эту операцию повторяют 2—3 раза. Утонченную пленку растворяют каплями метанола.

В нижнем хлороформном слое (≈ 60 %) концентрируются липиды. Для определения количества экстрагированных из исследуемой пробы липидов можно использовать два метода.

1. Исходный экстракт переносят в предварительно обезжиренную и взвешенную колбу со шлифом, присоединяют к роторному испарителю и отгоняют хлороформ под вакуумом (присоединяя к водоструйному насосу) с подогревом до 40 °С. Эта операция занимает 5—7 мин.

Если на стенке отгонной колбы остаются капли воды, их удаляют добавлением 0,2—0,3 мл ацетона с последующей его отгонкой.

После этого колбы с липидами тщательно протирают полотенцем и в открытом состоянии помещают в эксикатор, заполненный влагопоглощающим веществом. Через 2—3 ч взвешивают на аналитических весах. Определяют количество липидов, добавляют в колбу определенное количество хлороформ-метаноловой смеси (для получения раствора нужной концентрации), тщательно растворяют липиды и переносят их в пробирку с притертой пробкой, продувают азотом, закрывают и хранят в холодильнике.

2. Экстракт липидов доводят до определенного объема. 1—2 мл раствора переносят в предварительно взвешенный бюкс или небольшой стакан и помещают на песчаную баню под вытяжным шкафом или в термостат при 60 °С. Высушивают до постоянной массы. На основании количества липидов, обнаруженных в высушенном объеме экстракта, определяют концентрацию липидов в исследуемом субстрате.

Исходный или концентрированный экстракт после определения в нем концентрации липидов используют для определения содержания фосфолипидов, триацилглицеринов, холестерина или изучения жирнокислотного состава общих липидов.

Метод экстракции липидов спиртово-эфирной смесью (по Блюру). Принцип. Метод аналогичен предыдущему, но для экстракции применяют смесь других полярных (этиловый спирт) и неполярных (диэтиловый эфир) растворителей. В результате данный метод не обеспечивает полной экстракции фосфолипидов, ганглиозидов и протеолипидов.

Реактивы: смесь этилового эфира и диэтилового эфира (3 : 1); петролейный эфир.

Оборудование: пипетки на 1, 5 и 10 мл; колбочки с притертой пробкой на 50 и 100 мл; воронки; пробирки с притертой пробкой; бумажные фильтры; роторный испаритель; водяная баня; аналитические весы.

Ход определения. В плоскодонную колбу вносят необходимый объем сыворотки крови (1—3 мл или больше) или несколько граммов гомогената тканей, заливают 20 объемов спиртово-эфирной смеси, перемешивают и оставляют на 12 ч при комнатной температуре. Экстракцию можно ускорить кратковременным подогревом (2—3 мин) при температуре 40 °С. Липидный экстракт отфильтровывают от выпавшего белка и концентрируют выпариванием на роторном испарителе. Затем липиды экстрагируют тремя порциями петролейного эфира, отбрасывая нерастворимый осадок. Концентрацию липидов в экстракте определяют взвешиванием одним из изложенных выше методов.

Экстракт используют для определения главным образом холестерина и триацилглицеринов, поскольку фосфолипиды экстрагируются не полностью.

Клиническое значение. Физиологическая гиперлипемия отмечается через 1—3 ч после скармливания животным

кормов, обогащенных липидами, а также у кур, индеек, уток, гусей и других птиц (самок) в период их полового созревания, подготовки к яйцекладке и в период интенсивной продуктивности. Патологическая гиперлипемия наблюдается у коров с патологией обмена веществ и алиментарным бесплодием, при концентратном типе кормления, ожирении, остром и хроническом гепатите, хроническом нефрите, гипофункции щитовидной железы, передней доли гипофиза, недостаточной активности сывороточной липопротеиновой липазы (ЛПЛ), расщепляющей триацилглицерины сыворотки крови (фактор просветления).

Концентрация общих липидов в сыворотке крови в норме составляет у крупного рогатого скота 280—600 мг/100 мл, у свиней — 350—400, кур 360—2100 мг/100 мл.

Источник: 57.

Определение общих липидов в сыворотке крови с сульфофосфованилиновым реактивом (по Цёлнеру—Киршу в изложении Л. В. Орлова). Принцип. Метод основан на цветной реакции продуктов распада ненасыщенных липидов в серной кислоте с реактивом, состоящим из ванилина и ортофосфорной кислоты. Механизм цветной реакции заключается в том, что ненасыщенные липиды реагируют с серной кислотой при нагревании с образованием карбониевого иона, взаимодействие которого с активированной карбоксильной группой ванилина фосфата образует стабильный комплекс. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию общих липидов в сыворотке крови.

Реактивы: серная кислота (H_3SO_4) концентрированная (х. ч.) или для пробы Соваля;

ортофосфорная кислота (H_3PO_4) концентрированная;

ванилин (х. ч.), 0,6%-ный раствор. 0,6 г ванилина растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды с нагреванием на водяной бане, после охлаждения доводят объем до 100 мл. Раствор стабилен при хранении при комнатной температуре;

фосфор-ванилиновый реактив. 4 части ортофофорной кислоты смешивают с 1 частью 0,6%-ного раствора ванилина. Хранят в темной склянке при комнатной температуре;

хлороформ (х. ч. или для наркоза);

стандартный раствор в хлороформе триолеина или холестерина (х. ч.) со свежим топленым и профильтрованным сливочным маслом в соотношении 1 : 3 или общие липиды, выделенные из сыворотки крови или печени. Взвешивают на аналитических весах 1200 мг триолеина или других указанных липидов и растворяют в мерной колбе на 100 мл. Хранят в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; водяная баня; термостат; колбы мерные; пипетки; пробирки.

Ход определения. В пробирки (высотой 15 см) с 0,01 мл сыворотки крови добавляют 0,5 мл концентрированной серной

кислоты. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в кипящую водяную баню или термостат при температуре 130 °С на 20 мин. Водяная баня должна быть заполнена водой не ниже уровня жидкости в пробирках, поставленных в нее. Используемые для анализа пробирки и другую посуду моют отдельно, тщательно ополаскивают дистиллированной водой и спиртом. Через 20 мин пробирки охлаждают под водопроводной водой, приливают 1,5 мл сульфофосфованилинового реактива, тщательно встряхивают и выдерживают в темноте при комнатной температуре 45 мин. Содержимое пробирки постепенно меняет желтый цвет на красный, который стабильно удерживается до 18 ч.

Через 1 ч определяют оптическую плотность на ФЭКе или спектрофотометре при зеленом фильтре (500—560 нм) в кювете с толщиной слоя 0,5—1 см против холостой пробы. Холостую пробу готовят так же, как и опытную, но вместо сыворотки берут 0,01 мл воды. Если концентрация липидов низкая и недостаточно улавливается на ФЭКе, то для исследования берут двойную дозу сыворотки (0,02 мл).

Р а с ч е т ведут по калибровочному графику. Для его построения из стандартного раствора триолеина готовят рабочие калибровочные растворы (табл. 20).

20. Приготовление рабочих растворов для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор триолеина, мл	Хлороформ, мл	Концентрация общих липидов, мг%
1	0,17	0,83	200
2	0,33	0,67	400
3	0,50	0,50	600
4	0,67	0,33	800
5	0,83	0,17	1000
6	1,00	—	1200

Берут по 0,01 мл каждого разведения калибровочного раствора и выполняют все операции, как с опытными пробами (обязательно выдерживают в водяной бане точно так же, как и пробирки с исследуемой сывороткой). В противном случае цветная реакция с сульфофосфованилиновым реактивом не наступает или будет очень слабой, нехарактерной. Холостую пробу с дистиллированной водой можно не выдерживать в водяной бане.

На основании полученных данных строят калибровочный график.

Прямолинейная зависимость между концентрацией общих липидов и оптической плотностью сохраняется до 1200 мг%. Поэтому при большей концентрации сыворотку крови разводят физраствором и результаты умножают на разведение.

Для определения этим методом содержания общих липидов в тканях животных необходимо свежую или замороженную ткань

подвергнуть деэмолизу в 33%-ном растворе калия гидроксида. В пробирку помещают 200 или 300 мг ткани, прибавляют 3 мл 33%-ного калия гидроксида и выдерживают на кипящей водяной бане 60—120 мин, периодически встряхивая. Содержимое пробирок доводят дистиллированной водой до 5 мл и тщательно перемешивают. Из этого содержимого берут 0,2 мл в другую пробирку, приливают 1 мл серной кислоты и кипятят в бане или выдерживают в термостате при температуре 130 °С в течение 20 мин. После охлаждения приливают 2 мл сульфофосфованилиновой смеси и дальнейшие операции проводят так же, как описано выше с сывороткой крови. Однако в этом случае при исследовании на ФЭКе удобнее пользоваться кюветами с толщиной слоя 0,5 см. Сравнение определения концентрации общих липидов в известных стандартных растворах и в пробах, проводимое различными методами, показало высокую точность и воспроизводимость результатов.

Источник: 6, 29, 57.

3.3.6.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССОВ ЛИПИДОВ ХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Для количественного определения отдельных классов липидов используют готовый экстракт липидов, выделенный по методу Фолча, или берут пробы натуральных биосубстратов и поступают, как описано ниже.

Определение содержания фосфолипидов (по Бартлетту—Ушеру). Принцип. Метод основан на минерализации липидов с помощью хлорной кислоты. Неорганический фосфор, взаимодействуя с аммония молибдатом, образует фосфомолибденовую кислоту, которую восстанавливают эйконогеном и натрия пиросульфитом в молибденовую синь. По степени окраски, определяемой колориметрически, вычисляют количество неорганического фосфора, содержащегося в фосфолипидах. Фосфолипиды стабильны в сыворотке или в плазме крови в течение 1 дня при комнатной температуре, 1 нед при хранении в холодильнике.

Реактивы: экстракционная смесь Фолча (хлороформ–метанол, 2 : 1);

72 %-ная хлорная кислота ($HClO_4$) или смесь равных объемов 60%-ной хлорной и 95—97%-ной серной кислот (плотность 1,84);

5%-ный раствор аммония молибдата $[(NH_4)_6 \cdot Mo_7O_{24} \cdot H_2O]$;

сульфит-сульфоновый реактив. 13 г пиросульфита натрия ($Na_2S_2O_5$), 0,5 г сульфита натрия (Na_2SO_3) и 0,25 г эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота) растворяют в 100 мл дистиллированной воды (перегнанной в стеклянном дистилляторе) при постоянном встряхивании в течение 1 ч. Фильтруют через бумажный фильтр (лучше через синтетический № 4) и хранят в темной склянке. Реактив готовят еженедельно.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; песчаная баня; водяная баня; колбочки плоскодонные на 50 и 100 мл; ворон-

пробирки с притертыми пробками и делениями на 10 мл; пипетки.

Ход определения. Для анализа берут 0,5 мл сыворотки крови, 0,5 г гомогената тканей или 0,2—0,4 г желтка и экстрагируют по методу Фолча. В две параллельные пробирки вносят экстракт липидов в объеме, соответствующем 0,1 мл сыворотки крови, 0,02 г тканей или 0,01 г яичного желтка, добавляют по 0,6 мл хлорной кислоты и ставят на песчаную баню для сжигания при 180 °С. После просветления содержимого (через 1—1,5 ч) пробирки охлаждают и, тщательно перемешивая, последовательно добавляют следующие реактивы: по 4 мл дистиллированной воды, по 0,2 мл сульфит-сульфонового реактива и по 0,2 мл раствора аммония молибдата. Затем пробирки закрывают и помещают в водяную баню при 100 °С на 10 мин. После охлаждения колориметрируют при длине волны 660 или 830 нм в кюветах с толщиной слоя 0,5—1 см против контрольной пробы (без липидов).

Расчет ведут по калибровочному графику, для построения которого используют двузамещенный фосфорнокислый калий (K_2HPO_4), высушенный до постоянной массы. 2,194 г реактива растворяют в 500 мл бидистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 1 мг фосфора. Из основного раствора готовят рабочий раствор путем 50-кратного разведения водой (в 1 мл содержится 20 мкг фосфора). Если определение оптической плотности проводят на ФЭКе, то калибровочный график строят в пределах от 0,2 до 20 мкг, если же на спектрофотометре, то от 5 до 60 мкг фосфора (табл. 21).

21. Приготовление растворов для построения калибровочного графика

№ пробирки	Рабочий раствор K_2HPO_4, мл	Бидистиллированная вода, мл	Концентрация фосфора, мкг/мл
1	0,1	9,9	0,2
2	0,3	9,7	0,6
3	0,5	9,5	1,0
4	2,5	7,5	5,0
5	5,0	5,0	10,0
6	7,5	2,5	15,0
7	10,0	—	20,0

Из каждого разведения берут по 2 мл калибровочного раствора, вносят в 2—3 параллельные пробирки и далее проделывают все операции, как описано выше. На основании полученных данных строят калибровочный график.

Содержание общих фосфолипидов обычно выражают через количество содержащихся в них фосфатов — в ммоль/1 л, содержание отдельных фракций — также через содержание фосфатов или в процентах по отношению к сумме фосфора всех фосфолипидов.

Пересчет фосфора в фосфолипидах путем умножения на 25 нельзя признать правильным, так как это соответствует только для фосфотидилхолинов (лецитинов), в молекуле которых содержится 4 % фосфора. В других подклассах фосфолипидов доля фосфора иная.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Фосфолипиды поступают в кровь главным образом из печени, поэтому их уровень тесно связан с функциональным состоянием данного органа. Концентрация общих фосфолипидов в норме составляет у крупного рогатого скота 170—250 мг/100 мл, у свиней — 90—200 мг/100 мл. Повышение концентрации фосфолипидов в сыворотке крови отмечается при стеотозе (жировой дегенерации) печени, тяжелой форме сахарного диабета, нефрозе и нефрите, постгеморрагической анемии. Снижение уровня фосфолипидов — частый признак острого и хронического гепатита различной этиологии; оно отмечается также при неполноценном кормлении, особенно белково-витаминной недостаточности, при дисбалансе аминокислот в рационе, алиментарной дистрофии, анемиях.

Определение содержания триацилглицеринов (по Сардесаю и Маннингу). П р и н ц и п. Метод представляет собой модификацию метода Ван-Ханделя и Зильверсмита (1957) для прямого определения триацилглицеринов. Глицерол, освобожденный омылением, окисляется до формальдегида, концентрация последнего определяется колориметрически с применением реакции Hantzsch. Данный метод позволяет выявить триацилглицерины во всех биологических субстратах — сыворотке крови, печени, мышцах, жировой ткани и др.

Кровь с гепарином или с ЭДТА может храниться в вакуумной пробирке в течение 8 ч. Пробы не замораживают.

Р е а к т и в ы: экстрагирующая смесь (хлороформ-метанол 2 : 1 или спирт-эфир 3 : 1);

кремниевая кислота (силикагель), активированная при 105 °С в течение 10—12 ч;

спиртовой раствор калия гидроксида (КОН). 2 г КОН растворяют в минимальном количестве дистиллированной воды и объем доводят 95%-ным этиловым спиртом до 100 мл (основной раствор). Для приготовления рабочего раствора 10 мл основного раствора доводят 95%-ным этиловым спиртом до 50 мл (готовят в день применения);

0,1 моль/л раствор серной кислоты;

0,05 моль/л раствор метперйодата ($NaIO_4$);

0,5 моль/л раствор натрия арсенита ($NaAsO_2$);

ацетил-ацетоновый реактив, pH 6,0 при 25 °С. 150 г аммония ацетата, 3 мл ледяной уксусной кислоты и 2 мл ацетил-ацетонового реактива растворяют в 1 л дистиллированной воды. Реактив стоек в течение 2 нед при хранении в холодильнике;

1%-ный стандартный раствор триацилглицеринов. 1 г триолеина или оливкового масла растворяют в 100 мл хлороформа. Хранят в холодильнике, стоек 2 мес.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; водяная баня; пробирки обычные и центрифужные с делением; колбочки или пробирки на 10 мл; делительные воронки на 25 и 50 мл.

Ход определения. 0,1 мл сыворотки (плазмы) вносят в колбочку, заливают экстрагирующей смесью и тщательно перемешивают. Через 2—3 мин содержимое пропускают через обезжиренный бумажный фильтр в мерную колбочку, доводят объем экстрагирующей смесью до 10 мл. В делительную воронку на 25 мл вносят 8 мл дистиллированной воды и 8 мл фильтрата (что соответствует 0,08 мл сыворотки). Содержимое хорошо перемешивают, отстаивают и нижний слой пропускают через стеклянную колонку размером 0,8 × 16 см (для задержки фосфолипидов), приготовленную следующим путем: в центрифужную пробирку со спиленным дном помещают кусочек стеклянной ваты и 0,5 г активированной кремовой кислоты. Перед использованием колонку промывают 5 мл хлороформа. Фильтрат пробы собирают в мерную колбочку на 10 мл или пробирку с делениями. Колонку промывают хлороформом, который также собирают в колбочку. Объем доводят хлороформом до метки. Затем в 3 пробирки вносят по 3 мл фильтрата (что соответствует 0,024 мл сыворотки или плазмы) и после выпаривания растворителя в водяной бане в первые две пробирки добавляют по 0,5 мл спиртового раствора КОН (омыляемые пробы), а в третью — 0,5 мл спирта (неомыляемая проба). Пробирки инкубируют в водяной бане 15 мин при 60 °С. В конце инкубации в каждую из них добавляют по 0,5 мл 0,2 н. раствора серной кислоты, а затем по 0,1 мл 0,05 моль/л раствора метперйодата натрия (для окисления глицерина, освобожденного омылением).

Через 10 мин (точно!) окисление приостанавливают добавлением по 0,1 мл 0,5 моль/л раствора натрия арсенита. Через 5—7 мин, когда испарится осводившийся йод, пробирки извлекают из бани и в них добавляют по 0,8 мл воды и по 2 мл ацетил-ацетонового реактива. Содержимое тщательно перемешивают перевертыванием пробирки и инкубируют в водяной бане при 58 °С в течение 10 мин. Затем пробирки охлаждают до комнатной температуры и колориметрируют при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 0,5 см против контроля.

Степень поглощения омыляемой пробы минус степень поглощения неомыляемой пробы соответствует количеству триацилглицеринов, содержащихся в 0,24 мл исходного объема сыворотки (плазмы) крови. В используемом объеме сыворотки (плазмы) крови показания неомыляемых проб обычно очень малы и не имеют существенного значения.

Расчет ведут по формуле или калибровочному графику, который строят в пределах от 10 до 250 мкг/мл триацилглицеринов.

$$x = (E_{оп}/E_{ст})C_{ст},$$

где x — количество триацилглицеринов, мкг%; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{ст}$ — экстинкция стандартной пробы; $C_{ст}$ — концентрация триолеина в стандартном растворе, мг%.

Из основного раствора готовят серию рабочих калибровочных растворов (табл. 22).

22. Приготовление рабочих калибровочных растворов

№ пробирки	Стандартный раствор, мл	Хлороформ, мл	Концентрация триацилглицеринов, мкг/мл
1	0,1	9,9	10
2	0,5	9,5	50
3	1,0	9,0	100
4	1,0	4,0	200
5	1,0	3,0	250

В 5 опытных пробирок вносят по 1 мл каждого рабочего раствора и в шестую пробирку — 1 мл хлороформа для контроля на реактивы. Все пробирки помещают в кипящую баню на 10 мин для удаления хлороформа. Затем в них добавляют по 0,5 мл спиртового раствора калия гидроксида и процедуру продолжают, как описано выше.

Примечания. 1. Для анализа лучше использовать плазму крови, полученную на холоде, так как при получении сыворотки происходит частичный гидролиз триацилглицеринов. 2. В качестве антикоагулянта применяют ЭДТА натриевой или калиевой соли (1 мг на 1 мл крови). Гепарин применять не следует, так как он активирует липопротеидную липазу, гидролизирующую триацилглицерины.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Концентрация триацилглицеринов (нейтральных жиров) в сыворотке крови животных повышается при скармливании кормов, обогащенных жирами или богатых легкодоступными углеводами (картофель, зерно кукурузы, пшеницы и др.), активизирующих липогенез в печени (у моногастричных). Недостаток в рационах протеина и липотропных веществ (холина, метионина, треонина, селена, витамина Е, никотиновой кислоты и др.) также сопровождается нарастанием уровня нейтральных липидов в сыворотке крови животных. Увеличение концентрации триацилглицеринов отмечается при острых гепатитах, жировой дистрофии печени, нефрозах, диабете. Снижение их концентрации наблюдается при низком уровне кормления животных, усиленной молокоотдаче.

Нормативы содержания триацилглицеринов в сыворотке крови животных приведены в приложении 5.

Источник: 6, 29.

Определение содержания неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке (плазме) крови (по Лауреллу и Тибблингу). Принцип. Метод основан на образовании комплексных соединений НЭЖК с медью, которые с дифенилкарбазидом дают розово-малиновую окраску. По сравнению с другими он более чувствителен.

Реактивы: экстрагирующая смесь (ЭС) хлороформ-гептан 4 : 3 (по объему), содержащая 2 % метанола;

кремниевая кислота порошкообразная, предварительно активированная при 120 °С 12 ч;

меднотриэтаноламиновый реактив (Cu-ТЭА). 10 мл 0,5 моль/л раствора меди нитрата [$Cu(NO_3)_2$]: 10 мл 1 моль/л триэтаноламина (ТЭА) и 3,5 мл 1 моль/л натрия гидроксида растворяют в воде и доводят объем до 100 мл. В данном растворе растворяют 33 г NaCl, pH доводят до 8,1. Раствор готовят каждые 2 нед;

4%-ный раствор дифенилкарбазида (ДФК) в этаноле. Готовят ежедневно. Непосредственно перед применением 0,1 мл 1 моль/л ТЭА добавляют к 10 мл 0,4%-ного раствора ДФК;

стандартные растворы пальмитиновой кислоты (а. м. = 256,42) — 0,005 и 0,001 мкмоль/л. Для этого 25,642 мг пальмитиновой кислоты растворяют в 100 мл ЭС, получают 1 ммоль/л раствор. Затем 1 мл данного раствора доводят до 10 мл ЭС в мерной колбочке, получают 0,1 мкмоль/л. Далее из данного раствора путем разведения ЭС получают растворы с концентрацией 0,005 и 0,010 мкмоль/л пальмитиновой кислоты.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; пробирки с притертыми пробками на 15—20 мл; центрифужные пробирки с притертой пробкой на 10 мл; встряхиватель. Стеклянную посуду, предназначенную для определения НЭЖК, выдерживают несколько часов в 1 моль/л растворе HCl и тщательно моют деминерализованной водой.

Ход определения. В пробирку с притертой пробкой вносят 250 мг активированной кремниевой кислоты с последующим внесением 9 мл ЭС и по 0,075 мл сыворотки (плазмы). Пробирки немедленно закрывают, закрепляют со штативом в горизонтальном положении на встряхивателе и встряхивают 10 мин, затем дают 15 мин постоять и вновь встряхивают 1—2 мин (можно вручную).

Одновременно готовят стандарт. Для этого в 3 пробирки вносят по 0,5 г кремниевой кислоты, далее в первую пробирку добавляют 9 мл ЭС, во вторую 9 мл 0,005 мкмоль/л и в третью 9 мл 0,010 мкмоль/л раствора пальмитиновой кислоты. Пробирки стандарта встряхивают вместе с пробами. Затем пробирки центрифугируют 10 мин при 2500—3000 $мин^{-1}$ и 5 мл верхней фазы переносят в пробирки с притертой пробкой, куда добавляют 2 мл раствора Cu-ТЭА. Опять встряхивают и центрифугируют. После этого 3 мл верхней фазы (осторожно, не касаясь стенок и нижнего слоя) пе-

реносят в обычную пробирку (опыт и контроль) и добавляют по 0,5 мл раствора ДФК, перемешивают и оставляют стоять в темном месте. Через 15 мин развивается розово-малиновая окраска, интенсивность которой измеряют на ФЭКе или спектрофотометре при длине волны 550 нм против воды.

Р а с ч е т ведут по формуле

$$x = (A/B) \cdot 120,$$

где x — содержание НЭЖК, мкмоль/л; A — показатель пробы, мкмоль/л; B — показатель стандарта, мкмоль/л; 120 — постоянный коэффициент.

Перед расчетом из показаний экстракции стандартной пробы (0,010 мкмоль) следует вычесть показания экстинкции слепой пробы.

Расчет можно проводить и по калибровочному графику, который строят с использованием раствора пальмитиновой кислоты в пределах 0,005—0,025 мкмоль/л.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Концентрация НЭЖК в сыворотке крови (см. приложение 5) тесно связана с энергетической обеспеченностью организма животных и характеризует активность процессов мобилизации их из жировых депо. Поэтому при недостаточном поступлении энергии в организм, особенно в период раздоя, у самок птиц перед началом яйцекладки и в других случаях концентрация НЭЖК в сыворотке крови соответственно возрастает в 5—10 раз и более. Часто это предшествует параллельному увеличению концентрации кетоновых тел в крови.

Кратковременное повышение концентрации НЭЖК в сыворотке крови может быть результатом кормления по рационам, обогащенным кормовыми жирами; под влиянием инъекций адреналина; под воздействием стрессовых ситуаций; при сахарном диабете, ожирении, кетозе. Снижается концентрация НЭЖК при введении глюкозы и инсулина.

Источник: 4.

Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови. П р и н ц и п. В основу метода положена модифицированная Ильком реакция Любермана—Бурхарда, которая дает изумрудно-зеленое окрашивание в присутствии холестерина и смеси ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты. Данный метод позволяет определять содержание холестерина без предварительной экстракции липидов из сыворотки крови.

Р е а к т и в ы: 1) смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (1 : 5 : 1). При смешивании ингредиентов следует избегать нагревания смеси. Для этого колбу, в которой готовят реактив, помещают в сосуд со льдом, а серную кислоту добавляют в последнюю очередь медленно по каплям, постоянно помешивая. Смесь должна быть бесцветной или слегка желтого цвета и сохраняться в холодильнике;

2) стандартный раствор холестерина: 100 мг холестерина в 100 мл хлороформа.

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; термостат; пробирки; штатив для пробирок; пипетки мерные на 0,1 и 5 мл.

Ход определения. К 2 мл реактива 1 добавляют 0,1 мл негемолизированной сыворотки, встряхивают короткими энергичными движениями и помещают в термостат на 20 мин при 37 °С. Окрашенную в зеленый цвет жидкость колориметрируют на спектрофотометре (длина волны 650—660 нм) или на ФЭКе (красный светофильтр) в кюветах диаметром 0,5 см против контрольной пробы на реактивы (вместо сыворотки вносят 0,1 мл воды).

Расчет ведут по предварительно составленному калибровочному графику. Рабочий раствор холестерина готовят разведением стандартного в 10 раз (10 мл стандартного раствора + 90 мл хлороформа). 1 мл рабочего раствора содержит 0,1 мг холестерина. Затем в пробирки вносят по 0,1; 0,25; 0,50; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 и 3 мл рабочего раствора, что соответствует 0,025; 0,05; 0,10; 0,20; 0,25 и 0,30 мг холестерина. В седьмую пробирку вносят 1 мл хлороформа. Пробирки помещают в водяную баню для выпаривания досуха хлороформа; добавляют в них по 2 мл реактива 1 и далее поступают, как описано выше.

При постановке реакции используют абсолютно чистые и совершенно сухие пипетки и пробирки. Соотношение ингредиентов реактива рассчитано так, что белки сыворотки не выпадают в осадок. Появление мути может быть вызвано только наличием воды в реактиве или посуде.

При исследовании холестерина в экстракте липидов его вносят в пробирку в объеме, содержащем не более 1—5 мг чистых липидов.

Клиническое значение. Холестерин в сыворотке крови животных находится в двух формах: свободной (1/3) и эфирносвязанной с различными жирными кислотами (2/3). С возрастом концентрация холестерина (см. приложение 5) возрастает. Гиперхолестеринемия отмечается при диабете, нефрозах, пониженной функции щитовидной железы; в начале голодания; у свиней и птицы — при скармливании рационов, обогащенных твердыми кормовыми жирами. При острых гепатитах уровень общего холестерина в начале заболевания обычно повышается, а затем падает ниже нормы. Для заболевания печени характерно падение эфирной фракции холестерина. Острое падение этой фракции в крови — плохой прогностический признак, указывающий на острую желтую атрофию печени или острое отравление ее.

Определение содержания этерифицированного холестерина в сыворотке крови (по Балаховскому). Принцип. Метод основан на связывании свободного холестерина дигитонином (благодаря чему образуется нерастворимое в хлороформе соединение) и рас-

творении хлороформом эфирносвязанного холестерина. Хлороформенный экстракт, содержащий эфирносвязанный холестерин, используется для цветной реакции с реактивом Илька (или с другим специфическим реактивом).

Р е а к т и в ы: 1) экстрагирующая смесь (ЭС: хлороформ-метанол 2 : 1 или этанол-эфир 3 : 1);

2) 1%-ный спиртовой раствор дигитонина. 1 г дигитонина растворяют в 50 мл этилового спирта и доводят до 100 мл дистиллированной водой с подогревом;

3) смесь ледяной уксусной кислоты, уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты (1 : 5 : 1). Готовят, как описано выше.

О б о р у д о в а н и е: центрифужные пробирки; пробирки с притертыми пробками на 10 мл; пипетки на 0,1, 1 и 5 мл; штатив для пробирок; водяная баня; центрифуга; ФЭК или спектрофотометр.

Х о д о п р е д е л е н и я. 0,1 мл сыворотки (плазмы) крови вносят в центрифужную пробирку, содержащую 5 мл ЭС, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и оставляют стоять на 5—10 мин при использовании хлороформ-метаноловой смеси или на 1 ч при использовании спирто-эфирной смеси. Затем центрифугируют в течение 10—15 мин при 2000—3000 мин$^{-1}$. Центрифугат осторожно сливают в пробирку с притертой пробкой и ставят в водяную баню для выпаривания (не досуха, оставляют 0,5—1 мл центрифугата). Прибавляют 1 мл раствора дигитонина и перемешивают. Образуется белый налет — комплекс свободного холестерина с дигитонином. Оставляют стоять на 2—3 ч (или на ночь), после чего выпаривают досуха. После охлаждения в пробирку добавляют 5 мл хлороформа, тщательно взбалтывают. Хлороформенный экстракт фильтруют через обезжиренный бумажный фильтр или сливают после центрифугирования и используют для цветной реакции. С этой целью экстракт упаривают до минимума, добавляют 2 мл реактива 3, ставят в темное место на 20 мин, после чего колориметрируют. Хлороформ извлекает эфир холестерина, но не растворяет ни дигитонин-холестериновый комплекс, ни избыточный дигитонин.

Р а с ч е т ведут по калибровочной прямой, составленной для общего холестерина. По разности между общим и связанным находят количество свободного холестерина.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. В норме доля эфирносвязанного холестерина в сыворотке крови животных достигает 70—90, у птиц 60—70 %. В результате все изменения его содержания отражают главным образом состояние печени и поджелудочной железы, где синтезируется эта фракция. Снижение данной фракции часто является следствием поражения синтетической функции печени и (или) поджелудочной железы.

Источник: 7.

Определение содержания β-липопротеидов в сыворотке (плазме) крови (по Бурштейну в модификации Виноградовой). Липопротеиды (ЛП) сыворотки крови играют важную роль в жизнедеятельности организма. Они обеспечивают транспорт липидов как экзогенного (кормового) происхождения, так и синтезированных в печени и стенке тонкого кишечника (т. е. эндогенного происхождения) в систему циркуляции и далее к местам утилизации или депонирования; входят в состав клеточных мембран и ферментов; обезвреживают токсины; влияют на функцию свертывания крови и т. д.

Важнейшей физиологической функцией отдельных ЛП (α-ЛП) является удаление избытка свободного холестерина из клеток периферических тканей и обратный транспорт их в печень, где он окисляется в желчные кислоты и с желчью через кишечник выводится из организма. Наконец, ЛП осуществляет транспорт жирорастворимых витаминов, в том числе обладающих антиоксидантной активностью (α- и γ-токоферол, α- и β-каротин, убихинон и др.), а также стероидные гормоны и другие БАВ.

ЛП представляют собой водорастворимые комплексы, состоящие из липидной — холестерина (ХС), триацилглицерина (ТГ), фосфолипидной (ФЛ) и белковой части — аполипопротеида (АПО). Соотношение белок : липид может колебаться в широких пределах. И чем больше размер ЛП, тем больше в ней липидная часть, значит, меньше относительная плотность и меньше подвижность при электрофорезе.

Структура ЛП-комплекса, его липидный состав и обмен во многом определяются природой АПО, который активирует или тормозит соответствующие ферменты.

На основе неодинаковой относительной плотности при центрифугировании в растворах разной плотности или подвижности при электрофорезе в сыворотке крови млекопитающих различают четыре класса ЛП (табл. 23): хиломикроны (ХМ) — самый крупный по величине и самый легкий по относительной плотности класс. При центрифугировании флотирует по поверхности ($d < 1,006$), второй класс — ЛП очень низкой плотности (ЛПОНП, $d = 1,006—1,019$) или пре-β-ЛП. Затем идут ЛП низкой плотности (ЛПНП, $d = 1,006—1,063$) или β-ЛП и ЛП высокой плотности (ЛПВП, $d = 1,063—1,21$), или α-ЛП.

При электрофорезе ХМ остаются на старте, подобно γ-глобулинам, ЛПОНП, ЛПНП и ЛПВП занимают положение β, α_1- и

23. Состав и свойства липопротеидов

Класс	Плотность, г/мл	Диаметр частицы, нм	Приблизительная молекулярная масса, $\times 10^6$	Состав, %				
				ФЛ	ТГ	ХС	ЭХ	Белок
ХМ	0,95—1,006	200—500	$10^3—10^4$	5—10	80	10	7	2
ЛПОНП	0,99—1,006	20—70	5—100	20	55	13	5	10
ЛПНП	1,006—1,063	—	2—3	22	11	45	37	21
ЛПВП	1,063—1,21	—	0,25	26	6	18	15	50

α_2-глобулинов соответственно. У птиц в сыворотке крови содержится только три класса ЛП, ХМ у них не обнаружены. Как видно из таблицы 23, ХМ и ЛПОНП переносят в крови преимущественно ТГ, ЛПОНП — ХС и ЭХ, ЛПВП — ФЛ и ХЭ.

С изменением физиологического состояния организма животных меняется и роль отдельных классов ЛП в обмене липидов. Так, отмечено повышение концентрации ЛПОНП в сыворотке крови высокопродуктивных и жирномолочных коров, а у кур — в период пика яйцекладки.

В лабораторной практике из-за отсутствия доступных методов исследований роль ЛП в обмене веществ оценивают главным образом по сумме β-липопротеидов (ЛПОНП + ЛПНП).

Принцип. В основе метода лежит реакция избирательного осаждения β-липопротеидов декстрина сульфатом или гепарином в присутствии двухвалентных катионов.

Реактивы: 1,025 моль/л раствор $MnCl_2$; 1%-ный раствор гепарина (1 мл должен содержать 1000 МЕ; продажный гепарин, содержащий 25 000 МЕ в 5 мл, разводят дистиллированной водой 1 : 4).

Оборудование: ФЭК или спектрофотометр; пробирки; штатив для пробирок; стеклянные палочки; пипетки.

Ход определения. 2 мл 0,025 моль/л раствора $MnCl_2$ вносят в пробирку и прибавляют 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают и определяют оптическую плотность пробы (E_1) на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 0,5 см при длине волны 700—720 нм (красный светофильтр) против воды. Затем в кювету добавляют 0,04 мл 1%-ного раствора гепарина. Пробы тщательно перемешивают стеклянной палочкой и строго через 10 мин повторяют фотометрирование (E_2). Разница $E_2 - E_1$ приходится на оптическую плотность, обусловленную осадком β-липопротеидами. Умножая ее на коэффициент 1164 (определен расчетным способом), получают количество β-липопротеидов в сыворотке крови в мг%.

Примечание. Кровь берут натощак. Сыворотка сохраняется 2 сут.

Клиническое значение. Основная часть липидов сыворотки крови представлена в виде гидрофильных комплексов α- и β-липопротеидов. На долю β-липопротеидов приходится 60—70 % всех липидов сыворотки крови. Печень является не только местом синтеза, но и активного катаболизма ЛП, а следовательно, и выведения из организма продуктов обмена липидов (холестерина). Поэтому определение их концентрации имеет важное клинико-физиологическое значение.

Повышение концентрации β-липопротеидов в сыворотке крови отмечается при скармливании высокожировых кормов, при острых гепатитах, диабете, ожирении, гипотериозе, желтухах; снижение — чаще всего при длительном дефиците в рационе белка (протеина) или незаменимых липотропных аминокислот, когда нарушается синтез апопротеида.

Источник: 5, 8.

3.3.6.3. РАЗДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ НА КЛАССЫ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ТСХ)

Определение содержания отдельных классов липидов после их разделения методом ТСХ имеет ряд преимуществ перед описанным выше: во-первых, позволяет получить более точные данные, и, во-вторых, определение отдельных классов липидов можно автоматизировать и тем самым сократить время исследований.

Принцип. В основе метода лежит адсорбционная хроматография, которая основана на сорбции растворенного вещества твердой фазой — активным сорбентом. Подвижная фаза (растворитель разделяемой смеси веществ) движется по неподвижной фазе (сорбенту), и при этом разделяемые компоненты перемещаются с различной скоростью в направлении движения растворителя. В качестве сорбента для разделения липидов и фосфолипидов чаще применяют силикагель — соединение с общей формулой $SiO_2 \cdot nH_2O$. Адсорбирующие свойства силикагеля объясняются наличием группы —SiOH—, имеющей свободные водородные связи. Присутствие моно- или мультимолекулярных слоев адсорбированной воды ухудшает разделяющие свойства силикагеля. Поэтому нагревание (активирование) пластинки с силикагелем при 100—115 °С для удаления воды повышает разделяющую способность силикагеля.

Метод ТСХ позволяет разделить сложные смеси липидов на классы: фосфолипиды, моно-, ди- и триацилглицерины, НЭЖК, холестерин свободный и этерифицированный; в свою очередь, фосфолипиды на подклассы, фосфатидилхолин (лецитин), фосфатидилэтаноламин и т. д. и тем самым упрощает и повышает точность количественного определения отдельных классов и подклассов липидов, а также их выделение для дальнейшего изучения.

Разделение общих липидов на классы методом ТСХ включает следующие операции: приготовление тонкого слоя силикагеля на стекле; активизация его, нанесение общих липидов на тонкий слой; разделение липидов в системе растворителей; проявление и идентификация отдельных классов липидов; их количественное определение.

Реактивы: силикагель для ТСХ с величиной частицы 10—40 мкм, приготовленный путем измельчения отечественного гранулированного силикагеля марки КСК, или силикагель марки ЛС 5/40 (Чехия), или аналогичных марок других фирм;

петролейный эфир с точкой кипения 40—60 °С;

диэтиловый эфир (лучше для наркоза) с точкой кипения 35—36 °С;

уксусная кислота ледяная;

хлороформ перегнанный;

йод кристаллический;

5—10%-ный раствор фосфоромолибденовой кислоты или 10—15%-ный водный раствор серной кислоты;

свидетели—соединения отдельных классов липидов: фосфолипидов, триацилглицеридов, НЭЖК, холестерина свободного и эте-

рифицированного. В качестве таковых используют лецитин яичного желтка, трипальмитат или триолеат, пальмитиновую или другую жирную кислоту, холестерин и холестерин-эфир любой кислоты (3—5%-ной концентрации в хлороформе, ч. д. а.).

Оборудование (по Шталю): станок для фиксации пластинок, представляющий собой гладко выструганную доску длиной 100—120 см, шириной 20,7 см с гладкими бортиками по краям и высотой 1,5—2 см. В начале и конце станка также устанавливают бортики-ограничители. Перед работой плоскость станка покрывают на всю длину полиэтиленовой пленкой;

металлический аппликатор, позволяющий наносить слой силикагеля нужной толщины, который изготавливают из цельнометаллического прямоугольного бруска нержавеющей стали (он представляет собой как бы ящик без дна 19 × 5 см по внешним параметрам). Сверху с обеих торцевых сторон бруска оставляют специальные выступы для удобства его захвата при работе. Аппликатор плотно прилегает к поверхности стекла, но его задняя стенка имеет зазор (щель) высотой 3—5 мм, толщина которой регулируется закрепляющейся на винтах подвижной пластинкой (шторкой);

пластинки стеклянные 20 × 20 или любого другого размера; кассета для сушки и хранения готовых пластинок; стеклянная камера (прямоугольник или круглая) с притертой крышкой для хроматографии; сушильный шкаф; эксикатор; микропипетки на 0,1 мл и более; пульверизатор.

Ход определения. *Приготовление тонкого слоя и нанесение липидов.* Хорошо вымытые, обезжиренные стеклянные пластинки закладывают в станок. На старт и финиш станка кладу пластинки шириной не более 5—6 см. Все стекла еще раз протирают хлороформом. На старт помещают аппликатор с предварительно отрегулированной шириной зазора (250—300 мкм для разделения липидов на классы и 350—500 мкм для разделения фосфолипидов на подклассы), обращенного к переднему концу станка.

В коническую колбу вместимостью 150—200 мл отвешивают силикагель (из расчета 5 г на одну пластинку 20 × 20 см) и заливают двойным объемом дистиллированной воды, закрывают пробкой и энергично встряхивают 90 с до получения однородной массы (без пузырьков), затем быстро выливают в аппликатор и непрерывным плавным движением прибора наносят слой силикагеля на стеклянные пластинки. Слой должен быть гладким, без пустот и наплывов.

Пластинки оставляют на ночь при комнатной температуре, а перед использованием их помещают в сушильный шкаф на 1—2 ч при 110 °С для активизации. После охлаждения пластинки с нижнего края ее на 0,3—0,5 см удаляют силикагель, а на 1—1,5 см выше иглой намечают линию старта.

Пробы липидов наносят (осторожно!) микропипеткой или микрошприцем с иглой в виде отдельного пятна или полосы шириной 1—1,5 см. Расстояние от краев стекла составляет 2 см, а между про-

бами 2—3 см. Рядом с пробой наносят раствор каждого свидетеля в отдельности или их смесь.

Приготовление хроматографической камеры и подвижной фазы. Дно и внутренние стенки покрывают чистой фильтровальной бумагой и смачивают подвижной фазой, в которой будет проводиться разделение липидов. Это создает хорошее насыщение камеры парами подвижной фазы, что улучшает разделение. Подвижную фазу наливают в камеру в таком объеме, чтобы хорошо пропиталась фильтровальная бумага и на дне был слой толщиной 1—1,2 см. Камеру закрывают прошлифованной крышкой и ставят под вытяжной шкаф (все делается под вытяжным шкафом!).

В качестве подвижной фазы используют ряд смесей (табл. 24).

24. Состав подвижных фаз и соотношение в них отдельных компонентов, объем/объем

Компонент	Подвижные фазы					
	1	2	3	4	5	6
Петролейный эфир ($t_{кип}$ 40—60 °С)	85	80	82	90	85	—
Диэтиловый эфир ($t_{кип}$ 36—37 °С)	15	20	18	10	—	30
Гексан	—	—	—	—	—	70
Ацетон	—	—	—	—	15	—
Уксусная кислота ледяная	1	1	1	1	—	2

После того как хроматографическая камера насытится парами подвижной системы (10—20 мин), в нее вносят пластинку с нанесенными липидами, которую ставят вертикально или с небольшим наклоном (около 60°) к стенке камеры. В прямоугольную камеру ставят 2 пластинки в виде буквы V. Камеру быстро закрывают и оставляют при комнатной или пониженной температуре на 40—45 мин. Как только граница подвижной фазы достигнет линии, расположенной на 1 см ниже верхнего края (финиша), пластинку быстро извлекают и в горизонтальном положении подсушивают 10—15 мин под вытяжным шкафом.

Для проявления липидов отдельных классов пластинки спрыскивают из пульверизатора водным раствором серной кислоты или спиртовым раствором фосфоромолибденовой кислоты и прогревают в сушильном шкафу при 180—200 °С до обугливания. Липиды разных классов выступают в виде черных пятен. В этих случаях липиды отдельных классов (кроме фосфолипидов) разрушаются. Чтобы обнаружить липиды без разрушения, чаще используют пары йода. Несколько кристалликов йода насыпают в стеклянный бюкс, вносят несколько капель спирта и помещают в эксикатор. После того как произойдет некоторая возгонка йода, в эксикатор вносят

пластинку силикагелем вниз и крышку плотно закрывают. Через 10—15 мин липиды выступают в виде ярко-желтых или коричневых пятен. Пластинку вынимают, пятна отводят иглой и после испарения йода (под вытяжным шкафом) их соскабливают и переносят в пробирки для количественного определения.

Анализ классов липидов можно проводить без экстракции растворителем в присутствии силикагеля, используя вышеизложенные химические методы исследования. Но перед определением оптической плотности содержимое пробирок центрифугируют для осаждения силикагеля. При необходимости экстрагировать липиды от силикагеля используют метанол для фосфолипидов и хлороформ для ацилглицеринов, НЭЖК и холестерина.

При использовании подвижных фаз 1 и 3 классы липидов располагаются в одной, а при использовании фазы 5 — несколько в другой последовательности (табл. 25).

25. Значение Rf для отдельных липидных классов при использовании разных подвижных фаз

Класс липидов	Фазы 1 и 3		Фаза 5
	Липиды сыворотки крови	Липиды печени	Липиды сыворотки крови
Фосфолипиды	0,00	0,00	0,00
Моноацилглицерины	0,04	—	0,02
Диацилглицерины	0,08	0,08	0,40
Холестерин свободный	0,11	0,12	0,21
НЭЖК	0,20	0,23	0,07
Триацилглицерины	0,44	0,42	0,63
Холестерин этерифицированный	0,70	0,70	0,81

Для детектирования липидов отдельных классов на хроматографической пластинке в качестве свидетелей используют чистые препараты отдельных липидов. При отсутствии свидетелей можно пользоваться коэффициентом подвижности отдельных классов — Rf. Для его расчета замеряют общую длину разгонки на пластинке (от нижней до верхней границы), которую принимают за 100 %, а затем замеряют местоположение отдельных классов (по центру пятна), рассчитывают их прохождение в процентах относительно всей длины разгонки и сравнивают с литературными данными. На всех подвижных фазах фосфолипиды остаются на старте (на месте нанесения), а самым верхним классом являются эфиры холестерина.

Для разделения фосфолипидов на подклассы используют то же оборудование и тот же принцип приготовления тонкого слоя, как описано выше, но слой должен быть толще — 400—500 мкм. Это связано с тем, что для количественного определения индивидуаль-

ных фосфолипидов по фосфору необходимо наносить на пластину несколько больше липидов (5—10 мг).

В качестве подвижной фазы для разделения фосфолипидов методом одномерной хроматографии чаще всего используют подвижные системы, состав которых представлен в таблице 25а.

Концентрированный раствор липидов (5—10 %) наносят на пластину в виде полосы шириной 1,5—2 см или более. Разгон фосфолипидов занимает около 1 ч. После подсушивания пластины проводят детектирование и идентификацию отдельных подклассов фосфолипидов в парах йода или путем опрыскивания его 10%-ным раствором серной кислоты с последующим прогреванием в сушильном шкафу. Обугливание органической части молекулы отдельных фосфолипидов не влияет на количественное определение фосфора, выполняемое химическим путем.

Состав подвижных систем:

хлороформ-метанол-вода, 65 : 25 : 4;

хлороформ-метанол-32,5%-ный раствор аммиака, 70 : 30 : 5;

хлороформ-метанол-вода, 70 : 30 : 5.

Идентификацию индивидуальных фосфолипидов проводят с помощью свидетелей или по величине Rf в сопоставлении с литературными данными (табл. 25а).

Таблица 25а. Значение величины Rf для фосфолипидов при разделении их в разных системах

Подклассы	Подвижные системы		
	1	2	3
Фосфатидиловая кислота	0,87	—	—
Цереброзиды	—	0,64 (0,55)	0,79
Кардиолипин	0,77	0,55	0,84
Фосфатидилэтаноламин	0,52	0,45	0,58
Фосфатидилинозитол	0,40	0,11	0,20
Фосфатидилхолин	0,27	0,36	0,33
Фосфатидилсерин	0,21	0,06	0,10
Сфингомиелин	0,17	0,18	0,20
Лизолецитин	0,08	0,11	0,15
Старт	0,0	0,0	0,0

Значительную помощь в идентификации отдельных фосфолипидов оказывают специальные реакции. Так, фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин обнаруживаются после опрыскивания раствором нингидрида: 3 г нингидрида растворяют в 5 мл лутидина (2,6-диметилпиридин) и добавляют 95 мл н-бутанола, насыщенного водой. Появляется малиновая окраска, характерная для аминогрупп.

Фосфолипиды, содержащие холин (фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин и сфингомиелин), окрашиваются в оранжевый цвет реактивом Драгендорфа, который готовят из двух растворов: раствор I содержит 1,7 г $Bi(NO_3)_3 \cdot 5H_2O$ в 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты; раствор II содержит 40 г KI в 100 мл воды. Пластинки опрыскивают смесью, состоящей из 4 мл раствора I и 1 мл раствора II с добавлением 20 мл воды.

Фосфатидилинозитол окрашивается в коричневый цвет аммиачным раствором серебра, который состоит из равных объемов 0,1 н. раствора $AgNO_3$ и 1 н. раствора NH_3.

Количество индивидуальных фосфолипидов после ТСХ определяют по содержанию в них фосфора по методике, описанной выше для фосфолипидов.

Поскольку фосфолипиды разных подклассов содержат неодинаковое количество фосфора, их соотношение в исследуемых материалах выражают в мкг (мг) или в процентах неорганического фосфора по отношению к его содержанию в общих фосфолипидах.

3.3.6.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССОВ ЛИПИДОВ ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫМ МЕТОДОМ

П р и н ц и п. В основе метода лежит фотометрия плотности окраски отдельных классов липидов, разделенных методом ТСХ, в отраженном или проходящем свете.

Р е а к т и в ы: пластинки «Силуфол», UV-254 (Чехия) для качественного анализа методом ТСХ размером 150 × 150 мм;

стеклянные пластинки размером 200 × 200 мм;

подвижная фаза: петролейный эфир диэтиловый, эфируксусная кислота (85 : 15 : 1);

стандартная смесь липидов в хлороформ-метаноловой смеси (2 : 1) (табл. 26);

26. Примерный состав стандартной смеси липидов, %

Класс липидов	Источник липидов	Смесь, предназначенная для	
		животных	птиц
Фосфолипиды	Лецитин синтетический или выделенный методом ТСХ из яичного желтка	30—40	50—60
Холестерин	Холестерин синтетический (ч. д. а.)	3—6	1,5—3
НЭЖК	Пальмитиновая, стеариновая или олеиновая кислота, или их смесь (ч. д. а.)	3—5	0,3—1
Триацилглицерины	Триолеин (ч. д. а.)	10—15	30—40
Холестерин-эфир	Холестерин-пальмитат или холестерин-олеат (ч. д. а.)	30—35	1,5—3

3—5%-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле (свежеприготовленный).

Оборудование: денситометр — интегратор или сканиметр (отечественного или зарубежного производства); микрошприц на 1—5 (10) мкл; пульверизатор плюс все оборудование, используемое для разделения липидов методом ТСХ.

Ход определения. На пластинку «Силуфол» (после ее активизации в термостате при 100—105 °С в течение 3—5 мин) наносят микрошприцем не более 6 проб липидов (по 0,06—0,1 мг) в виде тонкой полосы шириной 8—10 мм (если используют стеклянные пластинки с более толстым слоем, то можно нанести 8—9 проб липидов по 0,2—0,3 мг и более). Пластинку опускают в камеру и после разгонки извлекают, подсушивают в горизонтальном положении, осторожно опрыскивают спиртовым раствором фосфорномолибденовой кислоты и прогревают в сушильном шкафу при 90—100 °С до появления четко выраженных пятен сине-голубого цвета (1—2 мин).

Запись фракций липидов проводят в день их разделения (при хранении обесцвечиваются). Для этого пластинку «Силуфол» разрезают ножницами по числу нанесенных проб (но не шире 4 см), укладывают в кассету денситометра и записывают при красном светофильтре в отраженном свете. Каждый класс липидов на хроматограмме выписывается в виде пика. Порядок расположения пиков тот же, что и на стеклянных пластинках. При разделении липидов сыворотки крови коров триацилглицерины нередко дают 2—3 следующих друг за другом пятна (пика).

Расчет. Относительную величину липидов отдельных классов рассчитывают по величине пиков. Для этого сначала определяют абсолютную площадь пиков путем умножения его высоты* на ширину на половине высоты от базисной линии. Полученные величины разных пиков суммируют и принимают за 100 %, а затем находят процентную долю каждого пика.

Полученные данные, как правило, не отражают действительную величину липидов соответствующего класса. Поэтому для каждого класса следует найти свой поправочный коэффициент. Для этого готовят стандартный раствор — смесь липидов определяемых классов (см. табл. 26) в хлороформ-метаноловой смеси. Небольшое количество смеси упаривают до концентрации 1—3 %, с помощью микрошприца наносят на пластинку в 8—10 повторностях и разгоняют при тех же условиях, как описано выше. После окраски пики записывают на денситометре и высчитывают относительную площадь каждого пика. Затем процентное содержание отдельного класса стандартной смеси делят на процентное содержание соответствующего класса, найденного после

* Для определения истинной высоты пиков, особенно с тупой вершиной, следует их боковые стороны удлинить вверх до пересечения. Точка пересечения и берется за истинную высоту.

27. Пример расчета поправочного коэффициента

Класс липидов	Содержание, %		А/Б	Величина коэффициента
	А*	Б**		
Фосфолипиды	40	6,75	40/6,75	5,92
Холестерин свободный	6	24,0	6/24,0	0,25
НЭЖК	5	5,81	5/5,81	0,86
Триацилглицерины	40	44,9	40/44,9	0,89
Холестерин-эфир	9	12,5	9/12,5	0,72

* А — содержание класса в стандартной смеси.

** Б — фактически обнаруженное содержание.

разделения методом ТСХ и денситометрии. Получаем поправочный коэффициент (табл. 27).

Аналогичный поправочный коэффициент можно рассчитать и для подклассов фосфолипидов. Хроматограммы, полученные на стекле, можно записывать только на сканиметре. Сначала проводят запись одной пробы, затем другой и т. д., постепенно передвигая пластинку под лучом проходящего света. Результаты регистрируют в процентах.

Для каждого прибора и (или) режима исследований должны быть выведены свои поправочные коэффициенты.

Источник: 6.

3.3.6.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ МЕТОДОМ ГАЗОЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ (ГЖХ)

П р и н ц и п. В основе метода ГЖХ лежат физико-химические свойства летучих соединений по-разному распределяться между двумя фазами: подвижной (инертный газ) и неподвижной (жидкой), нанесенной на поверхность порошкообразного твердого носителя определенного зернения и определенных адсорбционных свойств, где она распределяется в виде тонкой пленки с большой поверхностью и служит растворителем. Компоненты анализируемой смеси (смесь метиловых эфиров жирных кислот), перемещаясь по колонке с помощью газа-носителя, распределяются между газовой и жидкой средами и в соответствии с их коэффициентом распределения селективно удерживаются неподвижной жидкой фазой до тех пор, пока не образуется определенная зона (концентрация) в газе-носителе. Зоны отдельных жирных кислот последовательно выносятся из колонки газом-носителем, попадают в детекторное устройство, вызывают электросигнал, который регистрируется самописцем в виде пика и (или) цифрового изображения.

Р е а к т и в ы: инертные носители неподвижной фазы для хроматографической колонки: хромосорбы W, P, G и T, хромотон N, целит 545 и др. с величиной частиц 40/60, 60/80, 80/100 и 100/120 меш;

жидкие фазы, полярные и неполярные, которые должны обладать следующими свойствами (табл. 28);

28. Свойства жидких фаз

Жидкая фаза	Максимальная рабочая температура, °С	Растворитель
Диэтиленгликольсукцинат (полярная)	190	Ацетон
Диэтиленгликольадипат (полярная)	190	Хлороформ
Полиэтиленгликольсукцинат (полярная)	200	Хлороформ, ацетон
Полиэтиленгликольадипат	200	Ацетон, хлороформ
Апиезон D (неполярная)	300	Хлороформ

ацетон; хлороформ; гексан; бензол; диэтиловый эфир; соляная кислота (ч. д. а.); метанол; петролейный эфир; безводная смесь Na_2SO_4 и $NaHCO_3$ (2 : 1); стандартная смесь метиловых эфиров жирных кислот; метилирующая смесь: 0,5 н. раствор натрия метилата (CH_3ONa), или 0,3 н. хлористый водород в абсолютном метаноле, или 0,3%-ный раствор серной кислоты (H_2SO_4) в абсолютном метаноле.

О б о р у д о в а н и е: газожидкостный хроматограф отечественного или зарубежного производства. Прибор состоит из: а) хроматографической колонки (металлической или стеклянной), содержащей неподвижную фазу, в которой на входе располагается камера ввода анализируемого материала, а на выходе — детектор; б) термостатической камеры, обеспечивающей стабильную заданную температуру для хроматографической колонки; в) самописца; г) баллонов с газом-носителем, водородом и воздухом (для горючей смеси);

микрошприцы (марки Гамельтона) отечественного или зарубежного производства для введения анализируемого материала в камеру — испаритель хроматографа; запасные хроматографические колонки; расходометр — для определения скорости поступления газа-носителя, водорода, воздуха; силиконовые прокладки для герметизации колонок; пробирки с притертыми пробками на 10 мл; пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; пипетки бактериологические; груша резиновая (малая); стеклянные ампулы на 10 и 15 мл; колба Бунзена.

Х о д о п р е д е л е н и я. После установки и наладки всех (электронных и механических) систем прибора, что выполняется специально подготовленными инженерами, его подготавливают к работе в соответствии с целью и задачами исследований. В подготовительную работу входит: подготовка хроматографической ко-

лонки; выбор режима работы прибора и подготовка метиловых эфиров жирных кислот для их разделения.

Подготовка колонки. Эффективность разделения эфиров жирных кислот в значительной степени определяется качеством подготовки хроматографической колонки: ее внутренним диаметром, длиной и качеством набивки (носителем и жидкой фазой). Чаще всего используют металлические колонки (они надежнее стеклянных) с внутренним диаметром 3—5 мм и длиной от 1 до 3 м. Предварительно колонка должна быть тщательно промыта и высушена. Для промывки применяют чистые, профильтрованные реагенты в следующем порядке:

1) 1%-ный раствор поверхностно-активных веществ типа ОП-7, ОП-10, ТВИН-60 или ТВИН-80 в дистиллированной воде (трехкратно);

2) дистиллированную воду (трехкратно);

3) ацетон или метанол (двукратно);

4) бензол (двукратно);

5) диэтиловый спирт (двукратно);

6) растворитель, в котором будет растворяться неподвижная жидкая фаза (трехкратно).

После этого колонку продувают азотом и помещают в сушильный шкаф при температуре 70—80 °С на 1 ч.

Готовят наполнитель для колонки. Для этого подбирают соответствующую жидкую фазу и 5—15 % ее наносят на выбранный инертный носитель. Необходимое количество жидкой фазы (например, 10 г), растворенной в соответствующем растворителе (хлороформ или ацетон), вносят в круглодонную колбу со шлифом и туда же добавляют определенное количество (например, 100 г) твердого носителя. Колбу присоединяют к роторному испарителю и при вращении выпаривают растворитель полностью. Инертный носитель, пропитанный жидкой фазой, раскладывают тонким слоем на фильтровальной бумаге и подсушивают под вытяжным шкафом, а затем в термостате при 80—100 °С до хорошо выраженной сыпучести. В таком виде наполнитель готов для использования.

Колонку заполняют следующим образом. Один конец закрывают стеклянной ватой (на глубину 0,7—1,5 см) и присоединяют к вакуумному насосу, а к другому присоединяют воронку (через резиновую трубку). Наполнитель засыпают через воронку при постоянном постукивании палочкой до тех пор, пока колонка не заполнится полностью, после чего открытый конец закрывают стеклянной ватой. Наполнитель должен заполнить колонку достаточно плотно, без пустот. Для его уплотнения колонку можно присоединить к баллону с азотом и на 1—2 мин пустить с напором газ, постоянно постукивая палочкой.

После этого колонку вставляют в хроматограф и подвергают «тренировке», которая сводится к прогреванию ее в течение 15—20 ч при температуре несколько более высокой, чем та, при которой она будет работать, но ниже допустимой для данной жидкой фазы. В против-

ном случае последняя улетучивается. Во время прогревания колонки через нее пропускают слабый поток газа-носителя (5—10 мл/мин). При этом второй конец колонки, обращенный к детектору, не присоединяют, чтобы исключить загрязнение последнего.

После завершения «тренировки» колонки нагреватель термостата выключают, охлаждают до комнатной температуры, не выключая газ-носителя, что предупреждает конденсацию влаги внутри колонки при охлаждении. Затем колонку присоединяют к детектору, прибор включают и выводят на рабочий режим, на котором предусматривается разделение метиловых эфиров жирных кислот. В рабочий режим прибора входят следующие параметры: температура, скорость подачи газа-носителя, водорода и воздуха. От правильной установки и поддержания режима работы зависит качество разделения жирных кислот.

Выбор режима работы прибора. Для каждой марки хроматографа устанавливают свой режим, но чаще всего такой: температура колонки 160—190 °С, испарителя 220—240 °С, поток газов: носителя — 30—75 мл/мин, водорода — 40—60 и воздуха — 300—400 мл/мин. Для стабилизации режима работы прибор включают и прогревают при заданной температуре 1,5—2 ч. До прогревания прибора следует убедиться, что в газовой системе нет утечки газов. Для этого все контакты колонки с баллонами и прибором смазывают мыльной пеной. После прогревания нужно убедиться в стабильности температуры термостата и записной линии самописцев. С этой целью в колонку 2—3 раза вводят микродозы (1—3 мкл) хлороформа или гексана, для чего пользуются специальными микрошприцами вместимостью от 1 до 10 мкл.

Приготовление метиловых эфиров жирных кислот. Поскольку жирные кислоты нелетучие соединения, их перед введением в хроматограф следует перевести в летучие — метиловые эфиры. Приводим два наиболее удобных и быстро выполнимых способа метилирования жирных кислот.

1. Липидный экстракт в дозе, соответствующей 5—20 мг чистых липидов, вносят в пробирку с притертой пробкой и выпаривают растворитель струей азота. В пробирку добавляют 2 мл 0,5 моль/л натрия метилата, закрывают и оставляют стоять при комнатной температуре 30—40 мин или подогревают на песочной бане до 50—55 °С. Реакцию останавливают добавлением 0,2 мл 6 моль/л раствора HCl.

Затем в пробирку вносят 4 мл петролейного эфира и 4 мл дистиллированной воды, закрывают и содержимое энергично встряхивают, дают отстояться и с помощью бактериологической пипетки с резиновой грушей верхний петролейный слой переносят в пенициллиновый флакон с сульфат-карбонатной смесью и сушат 10 мин. После этого петролейный эфир и растворенные в нем метиловые эфиры переносят в короткую пробирку с притертой пробкой, петролейный эфир удаляют струей азота, а оставшиеся метиловые эфиры растворяют в 2—3 каплях хлороформа, гексана, сероуглерода или в другом подходящем растворителе и с помощью шприца вводят в хроматограф (0,5—1 мкл).

2. В ампулу вносят 5—20 мг липидов, раствор испаряют струей азота и добавляют 2 мл метилирующей смеси (0,3 н. раствор хлористого водорода или 3%-ный раствор серной кислоты в абсолютном метаноле). Ампулу запаивают на газовой горелке и помещают в термостат на 1—2 ч при температуре 105 °С. После охлаждения содержимое ампулы небольшими порциями переносят на бумажный фильтр и быстро просушивают под феном. Затем фильтр сгибают на угол и метиловые эфиры осторожно смывают гексаном (5—6 мл) в пробирку. Гексан удаляют струей азота (при 45—50 °С) до минимума, а сконцентрированные метиловые эфиры (соломенного цвета) используют для анализа.

Примечания. Метилирующие смеси в лабораторных условиях готовят следующим образом:

1) для приготовления 0,5 моль/л раствора натрия метилата (CH_3CONa) осторожно растворяют 2,299 г металлического натрия в 100 мл абсолютного метанола;

2) для приготовления 3%-ного раствора серной кислоты 1,63 мл H_2SO_4 (ч. д. а.) растворяют в 100 мл абсолютного метанола;

3) для приготовления 0,3 н. хлористого водорода поступают следующим образом. В колбу Бунзена на 0,5 или 1 л вносят 200—250 г натрия хлорида (NaCl), закрывают ее корковой или резиновой пробкой с отверстием, в которое вставляют делительную воронку на 200 мл, наполненную концентрированной серной кислотой (100—150 мл). По мере вливания (по каплям) кислоты в колбу с натрия хлоридом происходит реакция с выделением газообразного хлористого водорода, который через резиновый шланг, надетый на боковой отросток колбы и заканчивающийся стеклянной пипеткой, отводят во флакон с метанолом (через резиновую пробку), насыщая его до указанной выше концентрации. По завершении реакции в колбочку отбирают 10—15 мл метанола, вносят 1—2 капли индикатора Таширa и титруют 0,1 н. раствором NaOH для определения концентрации HCl;

4) если метиловые эфиры или липиды требуют хранения, то их следует продуть азотом, ампулы запаять, а пробирки закрыть пробками и залить парафином. Поместить в герметически закрывающуюся емкость и хранить в холодильнике;

5) если ставится цель изучить жирнокислотный состав отдельных классов липидов (фосфолипидов, триацилглицеринов, НЭЖК, эфиров холестерина) или подклассов фосфолипидов, то предваритель-

но их разделяют методом ТСХ на стеклянной пластинке (для количественного анализа). Экстрагируют определенным растворителем и метилируют любым указанным выше способом.

Разделение, идентификация жирных кислот и расчет площади их пиков. Пробу метиловых эфиров жирных кислот вводят в колонку специальным микрошприцем через самоуплотняющуюся резиновую мембрану инжектора путем быстрого нажатия на поршень. Если предусматривается получить только процентное соотношение жирных кислот в пробе, то точность объема вводимой пробы не имеет значения (однако он должен быть оптимальным). При калибровке прибора объем пробы должен быть точно измерен.

Как указывалось выше, смесь метиловых эфиров, проходя по колонке с газом-носителем, селективно удерживается жидкой фазой и распределяется в колонке по мере увеличения длины их углеродной цепи. Выходя из колонки, метиловые эфиры отдельных жирных кислот попадают в детектор и изменяют в нем электропроводность.

В настоящее время в лабораторной практике наибольшее применение получили газожидкостные хроматографы с пламенно-ионизационными детекторами и детекторами по теплопроводности (катарометрами).

Принцип работы ионизационных детекторов основан на том, что электропроводность газа прямо пропорциональна концентрации в нем заряженных частиц. Жирная кислота, выходящая из колонки в виде газа, смешивается с водородом и сжигается в атмосфере воздуха или кислорода. Ионы и электроны, образованные в пламени, попадают в межэлектродное пространство, уменьшают его сопротивление, в результате чего во внешней цепи возникает ток (электросигнал). Последний через усилитель регистрируется самописцем в виде соответствующих пиков.

Пламенно-ионизационный детектор чувствителен фактически ко всем соединениям, за исключением He, Ar, Kr, Ne, Xe, O_2, Cs_2, COS, $SiHCl_3$, SiF_4, H_2S, SO_2, NO, N_2O, NO_2, NH_3, CO, CO_2, H_2O, $SiCl_4$.

Принцип работы детектора по теплопроводности основан на том, что нагретое тело теряет тепло со скоростью, зависящей от состава окружающего газа, поэтому скорость теплоотдачи используется здесь для определения состава газа. Основным элементом катарометра служит металлическая нить, скрученная в спираль и расположенная внутри камеры в металлическом блоке. Нить нагревают, пропуская через нее постоянный ток. Температура нити определяется равновесием, устанавливающимся между входной электрической мощностью (I^2R) и мощностью тепловых потерь, связанных с отводом тепла окружающим газом. При пропускании через детектор чистого газа-носителя потеря тепла постоянная, поэтому температура нити также постоянная. При наличии в газе-носителе анализируемого вещества температура нити изменяется, что вызывает соответствующее изменение электрического сопротивления, передающегося на самописец.

Пламенно-ионизационный детектор во много раз чувствительнее катарометра.

В тех случаях, когда проба анализируемого вещества растворена в хлороформе или гексане, через несколько секунд после ее введения в колонку сигнал детектора от растворителя регистрируется резким сдвигом пера самописца, а после ее выведения возвращается обратно до или почти до базисной линии. Если в качестве растворителя используется сероуглерод, то сигнал не регистрируется.

Через несколько секунд или минут самописец начинает записывать сигналы, обусловленные выходом метиловых эфиров жирных кислот, начиная с самых коротких (6 : 0, 8 : 0, 10 : 0) и кончая самыми длинными (20 : 4, 22 : 0 и т. д.).

При разделении жирных кислот на полярных жидких фазах сначала выходят насыщенные, затем ненасыщенные, а на неполярных фазах, наоборот, сначала выходят ненасыщенные, а затем насыщенные жирные кислоты.

Время от момента введения пробы в колонку до момента выхода той или иной кислоты называется временем относительного удерживания. Установлено, что время относительного удерживания очередной кислоты по сравнению с предыдущей увеличивается на величину, равную 1,56. Величины времени удерживания используются для идентификации пиков.

Некоторые жирные кислоты имеют близкое время относительного удерживания, однако у каждой из них только одно определенное время удерживания, не зависящее от присутствия других компонентов.

При соблюдении режима работы хроматографа (температура и скорость потока газов) воспроизводимость времени удерживания может составлять 99—100 %.

Данные по относительному времени удерживания метиловых эфиров жирных кислот на полярной и неполярных фазах при разных температурах приведены в таблице 29. От полярности фазы в значительной степени зависит качество разделения анализируемых смесей жирных кислот.

29. Относительное время удерживания метиловых эфиров жирных кислот на полярной и неполярных фазах (по литературным данным)

Кислота	Код*	Относительное время удерживания		
		Полярная фаза	Неполярные фазы	
		полиэтиленгликоль-адипат (t = 180 °С)	полиэтиленгликоль-сукцинат (t = 200 °С)	апиезон L (t = 197 °С)
Каприловая	8 : 0	0,060	0,096	0,030
Пеларгоновая	9 : 0	0,082	0,136	0,047
Каприновая	10 : 0	0,134	0,181	0,073
Ундекановая	11 : 0	0,183	0,237	0,117
Лауриновая	12 : 0	0,261	0,322	0,180

Продолжение

Кислота	Код*	Относительное время удерживания		
		Полярная фаза	Неполярные фазы	
		полиэтиленгликоль-адипат (t = 180 °С)	полиэтиленгликоль-сукцинат (t = 200 °С)	апиезон L (t = 197 °С)
Тридекановая	13:0	0,362	0,412	0,250
изо	13:0	—	0,373	—
Миристиновая	14:0	0,510	0,565	0,420
изо	14:0	—	0,497	—
Миристолеиновая	14:1	0,600	—	—
Пентадекановая	15:0	0,705	0,704	0,66
изо	15:0	—	0,689	—
антеизо	15:0	—	0,689	0,68
Пальмитиновая	16:0	1,00	1,00	1,00
Пальмитолеиновая	16:1	1,15	—	0,90
Гептадекановая	17:0	1,40	1,29	1,51
Гептадеценовая	17:1	1,62	—	1,31
Стеариновая	18:0	1,97	1,75	2,36
Олеиновая	18:1	2,20	2,00	2,03
Линолевая	18:2	2,65	2,45	—
Линоленовая	18:3	3,25	3,16	—
Нонадекановая	19:0	2,90	2,27	—
Арахиновая	20:0	3,87	3,11	5,80
Эйкозеновая	20:1	4,44	—	—
Эйкозадиеновая	20:2	4,81	—	—
Эйкозатриеновая	20:3	5,30	—	3,65
Арахидоновая	20:4	6,56	5,44	3,48
Бегеновая	22:0	7,90	—	—

* Первые цифры означают количество атомов углерода в цепи, 0 — отсутствие двойных связей, 1, 2, 3 и 4 — количество двойных связей в молекуле жирной кислоты.

Для разделения метиловых эфиров жирных кислот, полярных соединений (фосфолипидов, свободных жирных кислот, холестерина, сфингомиелинов, а также жирных кислот общих липидов) обычно используют полярные фазы, а для разделения неполярных соединений (триацилглицеринов) — неполярные.

В зависимости от длины колонки, скорости потока газа-носителя и рабочей температуры время разделения смеси эфиров жирных кислот занимает от 40 до 60—70 мин. Чем короче колонка, выше температура и скорость потока газа-носителя, тем меньше время анализа. Однако при уменьшении длины колонки и повышении скорости газа-носителя разделение отдельных жирных кислот резко ухудшается. Поэтому длина колонки, скорость потока газа и температура должны быть оптимальными, что определяется качеством разделения. Чаще всего используют колонки длиной 1,5—2,5 м.

Идентификацию пиков жирных кислот на хроматограммах лучше всего проводить по стандартным смесям химически чистых метиловых эфиров жирных кислот. При этом следует начинать запись с простых смесей, содержащих 2—3, а затем 4—5 и больше жирных кислот, увеличивая их набор до максимума.

При отсутствии набора метиловых эфиров жирных кислот идентификацию проводят с помощью относительного времени удерживания отдельных жирных кислот, исходя из литературных данных (см. табл. 29).

Конечный результат разделения проб — определение абсолютного и относительного содержания в них отдельных жирных кислот. Оба эти расчета делают на основе установления площади того или другого пика, а также суммы площадей всех пиков. Поэтому правильное определение площади пика крайне важно. Существует несколько способов их вычисления на хроматограмме: 1) умножением высоты пика на ширину на половине его высоты (в мм); 2) вырезанием пиков и взвешиванием их (бумаги) на аналитических весах; 3) путем умножения высоты пика (мм) на относительное время удерживания кислоты в колонке хроматографа.

Наиболее признанным стал последний способ. За высоту пика с округлой вершиной берут точку пересечения двух линий, проведенных от базисной линии касательно боковых сторон пика. Полученную высоту (мм) умножают на время удерживания данного пика, которое определяется по расстоянию (мм) от момента введения пробы (первая реакция самописца) до центра (или верхушки) пика. Метод прост и дает точные результаты. Затем рассчитанные площади пиков суммируют (100 %) и рассчитывают долю (%) каждого пика (кислоты). При этом следует внести поправку на чувствительность детектора.

Первые пики, выходящие на самописце, обычно записывают на самой высокой чувствительности (это кислоты от 6 : 0 до 16 : 1—17 : 1). Затем чувствительность загрубляют 2—8 раза (все зависит от концентрации метиловых эфиров и характера пробы) до выхода наиболее больших по размеру пиков (от 18 : 0 до 18 : 2). Затем чувствительность вновь повышают до максимума и на ней заканчивают запись остальных жирных кислот (от 18 : 3 до 20 : 4—22 : 0) (см. табл. 29). Если проводится анализ жирных кислот в липидах морских рыб, то после бегеновой кислоты (22 : 0) выходят 22 : 1, 22 : 5, 22 : 6, т. е. эруковая, докозапентаеновая и декозагексаеновая кислоты соответственно.

Поэтому нельзя отключать самописец ранее чем через 50—60 мин, а иногда выжидают и больше. Исследователь должен быть уверен, что все метиловые эфиры из анализируемой пробы вышли из колонки. Иначе колонка будет загрязняться и ухудшит разделение жирных кислот.

Если необходимо определить абсолютное количество жирных кислот, содержащихся в анализируемой пробе, то полученную

площадь каждого пика умножают на поправочный коэффициент. Для этих целей готовят растворы жирных кислот известной концентрации (например, 5—10 мг/мл) в гексане или хлороформе и известное (точно!) количество вводят в колонку. После неоднократного повторения выводят среднюю величину площади пика той или иной кислоты. Такие средние величины, полученные для разных доз, позволяют вывести графическую зависимость площади пика от дозы кислоты (табл. 30).

30. Пример расчета поправочного коэффициента

Код кислоты	*B*, мкг	*П*, мм²	*П/B*	*K*
16: 0	10	400	40	1,000
18: 0	10	540	54	1,350
18: 1	10	600	60	1,500
18: 2	10	390	39	0,975
18: 3	10	310	31	0,775

Для того чтобы рассчитать поправочный коэффициент (*K*), первоначально находят отношение площади пика (*П*) к массе вещества (*B*) — *П/B*. Затем полученную для каждого пика величину рассчитывают относительно этой же величины определенной жирной кислоты, чаще всего пальмитиновой, поправочный коэффициент которой берут за 1,0.

Источники: 6, 72.

3.3.7. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО (СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО) ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ

Среди многочисленных показателей липидного обмена процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) играют важную роль не только в физиолого-биохимическом гомеостазе нормальной клетки, но и выступают как универсальное неспецифическое звено механизма развития различных патологических состояний организма.

ПОЛ — нормальный метаболический процесс, представленный во всех органах и тканях организма. Через стадию перекисных производных происходит биосинтез многих БАВ (простагландинов, гормонов и др.), а также регуляция активности ферментов. Равновесие свободнорадикальных процессов — основа нормального функционирования организма. Нарушение равновесия в сторону избыточного образования свободных радикалов связывают с ускоренным старением клеток, воспалительными процессами, стрессами, а пониженный уровень продуктов ПОЛ — с возможностью деструктивных перерождений клеток (С. Чевори и сотр., 1992).

ПОЛ представляет собой процесс непосредственного переноса кислорода на субстрат с образованием пероксидов, кетонов, альде-

гидов и других соединений. Реакция эта носит цепной самоиндуцирующий характер и возникает под воздействием активных форм кислорода: O_2^-, O_2^{2-}, HO, HO_2^{2-}. Особой активностью обладает супероксидный анион (O_2^-), который в организме может действовать как окислитель (акцептор электрона: $O_2^- + \bar{e} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) с образованием пероксида водорода и как восстановитель (донор электрона: $O_2^- + \bar{e} \rightarrow \bar{e} + O_2$) с образованием молекулярного кислорода. Этот процесс является определяющим звеном всей цепной реакции и от его скорости зависит скорость процесса в целом. Наиболее легко отрывается атом водорода от углерода, находящегося в α-положении по отношению к двойной связи в молекуле ненасыщенной жирной кислоты. В результате в молекулах жирнокислотных отстатков появляется система сопряженных двойных связей или конъюгированных диенов, которые легко взаимодействуют с кислородом с образованием пероксидных радикалов, а в дальнейшем и гидропероксидов. Это так называемые первичные продукты ПОЛ, которые крайне чувствительны к самым незначительным изменениям в составе компонентов окисления, концентрации его активаторов или ингибиторов.

Обладая высокой реакционной способностью, первичные продукты пероксидного окисления липидов повреждающе действуют на различные биомолекулы и в первую очередь на белки. Повреждающее действие липидных пероксидов и свободных радикалов на белковую молекулу реализуется за счет взаимодействия с SH-, NH_2- и CH_3-группами белков. Это является основой их инактивирующего действия на многие ферменты. Липидные пероксиды легко вызывают полимеризацию ферментов, увеличивают скорость потребления кислорода и разобщающе действуют на окислительное фосфолирирование в митохондриях. Первичные продукты ПОЛ разрушительно действуют не только на узловые ферменты гликолиза и цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) в дыхательной цепи, но также и на основное макроэргическое соединение организма — АТФ.

В результате взаимодействия ненасыщенных жирнокислотных остатков фосфолипидов липидного бислоя мембран с активными формами кислорода образуются и накапливаются гидропероксиды фосфолипидов, что увеличивает подвижность полипептидной цепи белков. Это сопровождается деформацией мембранного липопротеидного комплекса, повышенной проницаемостью биомембран клеток и субклеточных элементов для протонов и воды, ингибированием активности мембраносвязанных ферментов, появлением «пор» в структуре, фрагментацией и разрушением мембран, а в итоге — цитолизом и гибелью клетки.

Однако в связи с неустойчивостью в организме первичных продуктов ПОЛ к их исследованиям прибегают редко. Предпочтение

отдается определению концентрации более устойчивых вторичных и конечных продуктов ПОЛ, в частности малонового диальдегида (МДА) и соединений типа оснований Шиффа.

В противовес образованию различных продуктов ПОЛ в организме животных сложилась и активно функционирует специальная система антиоксидантной защиты, суть которой сводится к торможению процессов разрушения биомембран и нарушения функциональной активности белков-ферментов. Система антиоксидантной защиты состоит из ферментативных реакций, протекающих с участием таких ферментов, как супероксиддисмутаза (КФ.1.15.1.1), каталаза (КФ.1.11.1.6), пероксидаза (КФ.1.11.1.7), глутатионпероксидаза (КФ.1.11.1.9), глутатионредуктаза (КФ.1.6.4.2), и неферментативных соединений, среди которых особое место занимают витамин Е, а также витамин С, глутатион, каротин, витамины А и К, убихинон (коэнзим Q) и другие соединения.

На каждом из этапов развития пероксидных реакций существует своя специализированная система защиты. Часть этих систем строго специфична, например супероксиддисмутаза (СОД). Другие, такие, как глутатионпероксидаза (ГП), α-токоферол, обладают большей широтой действия и меньшей субстратной специфичностью.

Дополняющие друг друга ферментативная и неферментативная антиоксидантные системы в норме обеспечивают сдерживание активации процессов пероксидного окисления липидов и тем самым предупреждают поражение организма животных продуктами ПОЛ. На эффективность антиоксидантной системы значительное влияние оказывает полноценность кормления животных, особенно уровень обеспеченности их витаминами и микроэлементами.

Определение диеновых конъюгатов и кетодиенов полиненасыщенных жирных кислот в крови. Принцип. Процесс пероксидного окисления полиненасыщенных жирных кислот сопровождается перегруппировкой двойных связей и возникновением системы сопряженных диеновых структур, имеющих максимум поглощения при 232—234 нм с плечом в области 260—280 нм, соответствующим сопряженным кетодиенам.

Реактивы: экстрагирующая смесь: гептан-изопропиловый спирт 1 : 1 (об/об.); спирт этиловый 96%-ный.

Оборудование: спектрофотометр; водяная баня; центрифуга с охлаждением; баллон с газообразным азотом; пробирки химические и центрифужные; пипетки на 1,5 и 10 мл.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 1 мл гепаринизированной крови, приливают по 7 мл экстрагирующей смеси, закрывают корковыми (не резиновыми!) пробками и интенсивно встряхивают в течение 2 мин. Затем пробирки (пробы) центрифугируют в течение 15 мин при 3000 мин$^{-1}$ при температуре 0—4 °С. 2 мл верхнего гептанового слоя переносят в чистые химические пробирки и выпаривают в токе азота на водяной бане при 40—50 °С. К сухому остатку пробы приливают 3 мл этилового спирта,

пробирки интенсивно встряхивают, оставляют на 10—15 мин при комнатной температуре и перед измерением еще раз встряхивают.

Относительную плотность опытных проб измеряют на спектрофотометре при 232 и 273 нм против контрольной пробы (этилового спирта) в кюветах с ходом луча 10 мм.

В этих же пробах определяют содержание общих липидов сульфованилиновым методом.

Расчет содержания диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) ведут по формуле

$$C_{\text{дк(кд)}} = \frac{E_{4232(4273)}}{A},$$

где $C_{\text{дк(кд)}}$ — содержание диеновых (кетодиеновых) конъюгатов в единицах оптической плотности на 1 мг липидов; $E_{4232(4273)}$ — оптическая плотность пробы для диеновых (кетодиеновых) конъюгатов; A — содержание общих липидов в пробе.

Примечание. Гепаринизированную кровь исследуют не позднее 6 ч после взятия и хранении при температуре не выше 10 °С.

Клиническое значение. Повышение концентрации в крови (плазме и эритроцитах) диеновых конъюгатов (ДК) и кетодиенов (КД) полиненасыщенных жирных кислот свидетельствует об усилении в организме процессов ПОЛ, вызываемых как эндогенными [острые и хронические воспаления, сепсис, снижение антиокислительной активности (АОА) липидов и естественных антиоксидантов в организме — витаминов Е, С, К, каротина, фосфолипидов, селена и др.], так и экзогенными (лучевое поражение, эмоциональные, болевые и технологические стрессы и др.) факторами. Постепенное снижение концентраций ДК и КД до оптимального уровня свидетельствует об успешном лечении и благоприятном прогнозе. Резкое падение (ниже среднего уровня) концентраций указанных продуктов ПОЛ, как правило, свидетельствует о глубоких необратимых деструктивных процессах биологических мембран. Концентрация ДК у животных колеблется от 0,100 до 0,300 ед. опт. пл/мг липидов.

Источники: 11, 57.

Определение малонового диальдегида в крови. Принцип. При высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид (МДА) реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного триметинового комплекса, имеющего максимум поглощения при 532 нм.

Реактивы: 10%-ный водный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);

0,8%-ный раствор 2-тиобарбитуровой кислоты (2-ТБК) на дистиллированной воде. Готовят при нагревании в кипящей водяной бане в день исследований.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; центрифуга лабораторная (лучше рефрижераторная); баня водяная; весы ана-

оптические; пробирки химические и центрифужные; колбы мерные; пипетки с делениями разные.

Ход определения. К 2,5 мл гепаринизированной крови, внесенной в центрифужную пробирку, добавляют 2,5 мл раствора ТХУ, хорошо перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ в течение 15 мин и оставляют стоять на холоде 15 мин до образования крупных хлопьев. 3 мл надосадочной жидкости переносят в чистую центрифужную пробирку, прибавляют 1,5 мл раствора 2-ТБК и хорошо перемешивают. Затем пробы помещают в кипящую водяную баню на 15 мин (точно!). В ходе реакции развивается розовое окрашивание. Пробы вынимают из водяной бани, охлаждают под струей холодной воды и центрифугируют в течение 5 мин при 3000 мин$^{-1}$.

Одновременно с опытными готовят контрольную пробу, куда вместо крови вносят 2,5 мл воды. Все остальные операции проводят как и с опытными пробами.

Полученный центрифугат осторожно, не встряхивая, переносят в химические пробирки и измеряют оптическую плотность опытных проб против контрольной при длине волны 532 нм в кювете с расстоянием между рабочими гранями 1 см.

Расчет содержания малонового диальдегида (продуктов перекисления) ведут по формуле

$$C = \frac{E \cdot 10^6 \cdot 3}{1{,}56 \cdot 10^5},$$

где C — концентрация МДА, мкмоль/л; E — оптическая плотность пробы; 10^6 — коэффициент пересчета в мкмоль/л; 3 — фактор разведения; $1{,}56 \cdot 10^5$ — коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса МДА с 2-ТБК.

Примечание. Время кипячения проб (15 мин) должно быть строго выдержано, так как в противном случае с 2-ТБК реагируют другие химические соединения, содержащиеся в крови и дающие окрашенные комплексы, имеющие максимум поглощения в той же области спектра, что и триметиновый комплекс.

Клиническое значение. Активность свободнорадикального окисления липидов оценивают по накоплению липидных перекисей, которые определяют в форме малонового диальдегида (МДА). Повышение его концентрации свидетельствует об активации процессов ПОЛ или о снижении антиоксидантной защиты организма. Это вызывается как эндогенными, так и экзогенными факторами, указанными выше.

Пониженная и стабильная концентрация продуктов ПОЛ, наоборот, свойственна здоровому организму с хорошо функционирующей антиоксидантной защитой. Концентрация МДА у млекопитающих животных колеблется от 0,20 до 1,5, а у кур до 1,50—2,50 мкмоль/л крови.

Источники: 11, 18.

Определение флуоресцирующих оснований Шиффа. Принцип. Диальдегиды и ряд других конечных продуктов ПОЛ, взаимодействуя с N-концевыми остатками аминокислот, белков и аминогрупп фосфолипидов, образуют конъюгированные флуоресцирующие соединения типа оснований Шиффа. Эти соединения, представляющие собой комплексы липопротеидов, входящих в состав известного внутриклеточного образования — липофусцина («пигмента старения»), обладают выраженной стабильностью, медленной утилизацией и способностью накапливаться в организме. Флуоресцирующая способность его по сравнению с содержанием малонового диальдегида в 10—100 раз чувствительнее и не зависит от степени окисляемости системы. Соединения типа оснований Шиффа обладают высокой реактивной способностью и токсичностью, производя межмолекулярные «сшивки» и нарушения структур и функции биомембран.

Метод определения основан на измерении флуоресценций соединений типа оснований Шиффа, извлекаемых липидными растворителями из биологических материалов.

Реактивы: хлороформ; спирт метиловый; экстрагирующая смесь (ЭС); хлороформ-метанол 2 : 1 (об/об.); 0,1 н. раствор серной кислоты; стандартный раствор хинин-сульфата: 10 мг хинин-сульфата растворяют в 10 мл 0,1 н. растворе серной кислоты. Раствор может храниться в холодильнике в темной стеклянной посуде в течение 1 мес.

Оборудование: спектроколориметр «Спекол-10» с приставкой для измерения флуоресценции или спектрофотометр любой модели; весы аналитические; холодильник бытовой; центрифуга лабораторная; баня водяная; колбы мерные; пробирки химические и центрифужные; пипетки разного объема.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 1 мл сыворотки крови, приливают по 4 мл экстрагирующей смеси и тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Пробирки плотно закрывают корковыми пробками, помещают в водяную баню на 5 мин при температуре 30 °С, вынимают из бани и тщательно встряхивают в течение 1 мин. Затем пробы центрифугируют в течение 15 мин при 3000 мин$^{-1}$. Водный слой осторожно отсасывают. Белковый слой протыкают стеклянной палочкой и нижний хлороформный экстракт липидов фильтруют в чистые пробирки через смоченный хлороформом бумажный фильтр. Измеряют флуоресценцию экстрактов при длине волны возбуждения 435—440 нм. Флуоресценцию стандартного раствора измеряют после его разведения в 1000 раз, до концентрации 1 мкг/л. Измеряют также флуоресценцию чистого хлороформа.

Расчет содержания флуоресцирующих оснований Шиффа ведут по формуле

$$A = \frac{E_0 - E_{хл}}{E_{ст} - E_{хл}},$$

где A — содержание оснований Шиффа, относительных единиц на 1 мл сыворотки; $F_{оп}$ — флуоресценция опытной пробы; $E_{ст}$ — флуоресценция стандартного раствора хинин-сульфата, принятая за 1 ед.; $E_{хл}$ — флуоресценция чистого хлороформа.

Примечания. 1. Сыворотку для анализа можно хранить в холодильнике не более 1 сут. 2. Хлороформ перед использованием очищают перегонкой.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Концентрация в сыворотке крови животных флуоресцирующих оснований Шиффа колеблется от 0,10 до 0,30, в том числе у кур от 0,30 до 0,60 отн. ед/мл сыворотки. Активизация процессов ПОЛ, вызываемых различными эндогенными и экзогенными факторами, указанными выше, сопровождается увеличением концентрации соединений типа оснований Шиффа.

Источник: 11.

3.3.8. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА

Определение активности супероксиддисмутазы (КФ.1.15.1.1) в эритроцитах. П р и н ц и п. Метод основан на торможении супероксиддисмутазой (СОД) восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения (формазаны).

Р е а к т и в ы: 0,2 ммоль/л раствор ЭДТА-Na. 37 г ЭДТА-Na (трилон Б) растворяют в 500 мл дистиллированной воды;

0,05 моль/л раствор тетраметилендиамина (ТЭМЭД). 0,28 мл ТЭМЭД растворяют в 40 мл 0,2 ммоль/л раствора ЭДТА-Na. Реактив годен для использования через 2 ч после приготовления в течение 1 сут;

0,034 ммоль/л раствор рибофлавина. 1,3 мг рибофлавина растворяют при перемешивании на магнитной мешалке в течение 20—30 мин в 100 мл дистиллированной воды. Раствор хранят в склянке из темного стекла. Годен в течение рабочего дня;

0,85 ммоль/л раствор пара-нитротетразолия хлористого (п-НТХ). 32 мг п-НТХ растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Реактив растворяется медленно, поэтому следует это делать на магнитной мешалке с подогревом до 50 °С. Хранят в склянке из темного стекла в течение 1 мес;

0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,8. 1,3616 г KH_2PO_4 растворяют в 100 мл воды; 16,036 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ растворяют в 900 мл воды. К одной части раствора калия фосфата добавляют 9 частей раствора натрия фосфата и pH определяют в помощью pH-метра;

0,1 моль/л буфер, pH 9,85. Для этого половину буферного раствора с pH 7,8 оставляют, а другую половину с помощью концентрированного раствора KOH доводят до pH 9,85;

1%-ный раствор калия йодида;

0,9%-ный раствор натрия хлорида;

хлороформ-этаноловая смесь (ХЭС) в соотношении 5 : 3 (об/об.).

Оборудование: ФЭК; лампа дневного света мощностью 40 Вт, длина трубки 1 м и более; штатив для пробирок на 20—30 гнезд в один ряд, закрытый спереди и сзади черной бумагой; весы аналитические; магнитная мешалка; секундомер; центрифуга рефрижераторная; холодильник бытовой; баня водяная; колбы мерные; пипетки с делениями разные; пробирки химические и центрифужные.

Ход определения. Для исследования берут эритроциты, отмытые трижды холодным 0,9%-ным раствором натрия хлорида из 0,5 мл гепаринизированной крови, добавляют 5 мл охлажденной до 1—4 °С дистиллированной воды и ставят в ледяную баню на 15 мин для полного гемолиза. Затем 1,5 мл гемолизата переносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,5 мл ХЭС, перемешивают и оставляют стоять на 10—15 мин в ледяной бане. После этого пробирки центрифугируют при 0—4 °С и 3000 $мин^{-1}$ в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (бесцветную или слегка желтую) разбавляют дистиллированной водой в 20 раз. Половину полученного раствора (биологического материала) оставляют в химических пробирках в ледяной бане, другую половину помещают в кипящую водяную баню на 10 мин (вода должна постоянно кипеть) для инактивации фермента.

Для каждой пробы берут по три химических пробирки, ставят в закрытый штатив и добавляют в них растворы реактивов и биологический материал (табл. 31).

31. Порядок приготовления растворов для определения активности КФ 1.15.1.1

№ п/п	Реактив	Опыт, мл	Контроль, мл	Контроль на реактив, мл
1	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,8	1,0	1,0	—
2	0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 9,85	—	—	2,0
3	0,05 моль/л ТЭМЭД	1,0	1,0	—
4	0,85 моль/л п-нитратетразоля	1,0	1,0	1,0
5	Вода дистиллированная	5,0	5,0	5,0
6	Биологический материал (БМ)	0,2	—	—
7	БМ после кипячения	—	0,2	0,2
8	0,034 ммоль/л раствор рибофлавина	2,0	2,0	2,0

Содержимое пробирок старательно перемешивают и штатив с ними устанавливают на расстоянии 20 см от лампы дневного света. Включают лампу, прогревают ее в течение 10 мин. Открывают переднюю стенку штатива, облучают пробы в течение 5 мин (по секундомеру) и закрывают переднюю стенку штатива.

Во все пробирки добавляют как можно быстрее по 1 мл 1%-ного раствора калия йодида (для остановки реакции) и сразу интенсивно перемешивают.

Измеряют оптическую плотность каждой пробы при зеленом светофильтре в кюветах с ходом луча 20 мм против дистиллированной воды.

Количество гемоглобина в гемолизатах определяют цианидным методом с помощью специальных наборов НПО «Биореактив».

Процент торможения СОД образования фармазана п-НТХ определяют по формуле

$$T = \frac{E_к - E_{оп}}{E_к - E_{кр}} \cdot 100,$$

где T — процент торможения реакции; $E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы; $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_{кр}$ — оптическая плотность пробы контроля на реактивы; 100 — коэффициент для перевода в проценты.

Принято считать, что 50 % ингибирования реакции соответствует одной относительной единице (1 отн. ед.) активности фермента.

Количество отн. ед. активности фермента, внесенного в пробу, рассчитывают по формуле

$$M = 10^{(0,026 \cdot T - 1,3)},$$

где M — количество отн. ед. активности в пробе; T — процент торможения реакции.

Активность СОД в пересчете на содержание гемоглобина рассчитывают по формуле

$$A = \frac{M E_{ст}}{0,1236 E_{гем}},$$

где A — активность фермента (СОД), ед. акт/мг гемоглобина; M — количество единиц фермента в пробе; $E_{ст}$ — оптическая плотность стандартного раствора, содержащего 59,75 мг гемоглобинцианида в 100 мл; $E_{гем}$ — оптическая плотность опытной пробы гемолизата при определении гемоглобина.

Примечания. 1. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4 °С не более 1 сут. 2. Химические пробирки, в которых ведется определение активности фермента, должны быть одинаковыми по диаметру, толщине стенок и цвету стекла. 3. В добавке биологического материала должна содержаться примерно 1 ед. активности фермента (степень торможения должна составлять 35—55 %). 4. При определении активности СОД в эритроцитах крови птиц отмытую эритроцитарную массу из 0,5 мл крови лизируют 2,5 мл холодной дистиллированной воды. Центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ в течение 15 мин для осаждения ядер эритроцитов. Берут 1,5 мл надосадочной жидкости и далее продолжают исследование, как указано выше.

Клиническое значение. Супероксиддисмутаза встречается во всех клетках и является ключевым ферментом антиоксидантной защиты в организме, которая попарно дисмутирует (превращает) супероксидные анионы в пероксид водорода и молекулярный кислород ($O_2^- + O_2^- + \frac{2H^+}{СОД} \rightarrow H_2O_2 + O_2$) и тем самым защищает клетки от токсичных форм кислорода в самом начале процесса ПОЛ. Активность СОД в крови и печени повышается в 1,5—5 раз во всех случаях, когда в клетках нарастает концентрация супероксидных анионов (O_2^-), что наблюдается при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, легких, инфаркте миокарда и других заболеваниях сердца и сосудов, термических ожогах, болезнях печени, особенно при жировой дистрофии, при онкологических поражениях, химических отравлениях, эмоционально-болевых и других стрессах.

Снижение активности СОД отмечено при ишемии миокарда, печени, почек, скелетных мышц, хотя уровень липидных пероксидов в этих случаях возрастает. Аналогично снижается активность СОД при хроническом гепатите, фиброзе, циррозе, глубоких деструктивных поражениях печени.

Показатели активности СОД у здоровых взрослых животных и птиц колеблется от 1,0 л 7,5 ед. акт/мг гемоглобина.

Источники: 11, 26, 47.

Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6) в крови. Принцип. Метод основан на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм.

Реактивы: 0,04412 н. раствор пероксида водорода. Готовят примерно 0,08%-ный раствор H_2O_2 и устанавливают точную концентрацию титрованием 0,01 н. раствором $KMnO_4$. На титрование 5 мл 0,04412 н. раствора H_2O_2 должно пойти 22,06 мл 0,01 н. раствора $KMnO_4$. По результатам титрования раствор H_2O_2 доводят до нужной концентрации дистиллированной водой;

4,5%-ный раствор аммония молибденовокислого. 4,5 г молибдата аммония растворяют в 95,5 мл дистиллированной воды;

0,1 моль/л трис-HCl-буфер, pH 7,4;

буферно-субстратная смесь: 10 мл трис-HCl-буфера смешивают с 30 мл 0,04412 н. раствора H_2O_2.

Оборудование: спектрофотометр; баня водяная; весы аналитические; секундомер; бюретки; пипетки с делениями; пробирки химические.

Ход определения. К 0,5 мл гепаринизированной крови приливают 3,5 мл дистиллированной воды, хорошо перемешивают и оставляют на 5—10 мин при комнатной температуре — основной гемолизат. К 0,2 мл основного гемолизата прибавляют 3,8 мл воды и тщательно перемешивают — рабочий гемолизат. В две химические пробирки наливают по 2 мл буферно-субстратной смеси и

выдерживают в водяной бане при 37 °С в течение 10 мин. В одну из пробирок (опытную) добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, тщательно перемешивают и инкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 3 мин (по секундомеру). Реакцию останавливают добавлением в опытную пробу сначала 2 мл молибдата аммония, а затем 0,1 мл рабочего гемолизата.

Измеряют оптическую плотность опытной и контрольной проб при 410 нм в кювете с ходом луча 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь, состоящую из 1 мл буфера, 3 мл дистиллированной воды и 0,1 мл рабочего гемолизата.

Активность каталазы рассчитывают по формуле

$$A = \frac{(E_к - E_{оп}) \cdot 4{,}1 \cdot 16 \cdot 10^5 \cdot 10^6}{22{,}2 \cdot 10^6 \cdot 3},$$

где A — активность фермента, МЕ (мкмоль пероксида водорода/л · мин); $E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы; $E_{оп}$ — оптическая плотность опытной пробы; 4,1 — конечный объем пробы; $16 \cdot 10^5$ — фактор разведения; 10^6 — коэффициент пересчета в мкмоль/л; $22{,}2 \cdot 10^6$ — коэффициент малярной экстинкции H_2O_2; 3 — время инкубации, мин.

Примечание. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4 °С в течение 1 сут.

Клиническое значение. Каталаза — гемсодержащий фермент, встречаемый во всех тканях, где происходят процессы клеточного дыхания с участием цитохромов, т. е. где возможно образование пероксида водорода — весьма токсичного для клеток соединения, которое должно быть удалено. Каталаза содержит четыре гемовых группы на одну молекулу фермента. Наибольшая активность фермента обнаружена в печени, эритроцитах и почках. Она с высокой степенью эффективности разлагает пероксид водорода на воду и молекулярный кислород: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Каталаза — наиболее активный из известных фермент окислительно-восстановительной системы. Одна молекула ее способна разложить 44 000 молекул пероксида водорода в 1 с. Функция фермента — предотвращение накопления в клетках H_2O_2, образующегося, в частности, при дисмутации супероксидного аниона. Активность данного фермента возрастает всегда, когда активизируются процессы ПОЛ в организме и возрастает концентрация H_2O_2 в клетках.

В норме активность каталазы в крови животных колеблется от 20 до 60, в том числе у кур от 40 до 60 мкмоль H_2O_2/л · мин · 10^3.

Источники: 11, 77.

Определение активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) в крови. Принцип. Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина пероксидом водорода при участии фермента с образованием окрашенного продукта реакции, имеющего максимум поглощения при 520 нм.

Реактивы: 2,5 ммоль/л раствор бензидина. 184,2 мг бензидина растворяют при нагревании в смеси из 100 мл дистиллиро-

ванной воды и 2,3 мл ледяной уксусной кислоты. После полного растворения бензидина раствор охлаждают и растворяют в нем 5,45 г трехводного натрия ацетата. После этого общий объем раствора доводят дистиллированной водой до 400 мл;

0,333 н. раствор пероксида водорода: сначала готовят 0,6%-ный раствор его и концентрацию пероксида определяют титрованием 0,1 н. раствором перманганата калия. На титрование 3 мл 0,333 н. раствора H_2O_2 должно пойти 10 мл 0,1 н. $KMnO_4$. По результатам титрования раствор H_2O_2 доводят до нужной концентрации дистиллированной водой.

Оборудование: спектрофотометр с термостатируемой кюветой; ультратермостат; весы аналитические; секундомер; бюретки для титрования; пробирки химические.

Ход определения. К 0,1 мл основного гемолизата гепаринизированной крови (приготовленный, как описано выше при определении активности каталазы) прибавляют 19,9 мл дистиллированной воды — рабочий гемолизат.

В термостатируемую кювету с ходом луча 10 нм приливают 2 мл раствора бензидина и 0,5 мл раствора пероксида водорода, предварительно подогретых до 37 °С. Содержимое кюветы перемешивают, открывают шторку камеры фотоэлемента спектрофотометра и, изменяя ширину щели, устанавливают показания спектрофотометра на нулевую отметку шкалы оптической плотности при длине волны 520 нм. В кювету добавляют 0,1 мл рабочего гемолизата, перемешивают и ровно через 1 мин (по секундомеру) снимают показатели оптической плотности опытной пробы.

Для учета изменения оптической плотности за счет неферментативного окисления бензидина аналогично опытной пробе проводят измерение оптической плотности контрольной пробы, содержащей вместо рабочего гемолизата 0,1 мл дистиллированной воды.

Расчет активности пероксидазы крови проводят по формуле

$$A = \frac{(E_o - E_к) \cdot 16{,}08 \cdot 10^6}{60},$$

где A — активность фермента, ед. опт. пл/л · с; E_o — оптическая плотность опытной пробы; $E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы; $16{,}08 \cdot 10^6$ — фактор разведения; 60 — время проведения реакции, с.

Примечания. 1. Поскольку метод требует определения оптической плотности реакционной смеси в строго определенный момент времени, целесообразно использовать спектрофотометр с цифровой регистрацией результатов времени. 2. Пробы гепаринизированной крови можно хранить при 4 °С в течение 1 сут.

Клиническое значение. Пероксидаза в отличие от каталазы содержит одну гемовую группу на одну молекулу фермента. Она менее широко распространена в живой природе. В организме животных и человека пероксидаза содержится в слюне, соке

поджелудочной железы, в тонком и толстом кишечнике, печени, почках, селезенке, легких, лейкоцитах. Как и каталаза, пероксидаза восстанавливает H_2O_2 до воды и молекулярного кислорода (O_2), используя в качестве доноров водорода фенолы, амины, органические кислоты. Пероксидазная активность крови обусловлена в основном ее наличием в гранулоцитах. Она адсорбируется на мембранах фагоцитированных бактерий, генерирует альдегиды, синглетный кислород, другие свободные радикалы, которые повреждают клетки. Ее активность в крови колеблется от 30 до 65 ед. опт. пл./л · с.

Источник: 11.

Определение активности глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) в крови. Принцип. Глутатионпероксидаза (селенсодержащий фермент), восстанавливая гидропероксиды, окисляет восстановленный глутатион ($H_2O_2 + G—SH \rightarrow 2H_2O_2 + G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$), по уменьшению которого в среде инкубации определяется активность фермента.

Реактивы: 0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4. Для этого 6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл дистиллированной воды, 11,4 г $K_2HPO_3 \cdot 3H_2O$ в 500 мл воды и смешивают полученные растворы под контролем pH-метра до необходимого pH;

31,88 ммоль/л раствор восстановленного глутатиона. 24,29 мг восстановленного глутатиона, 14,52 мг натрия азида и 27,68 мг ЭДТА-Na растворяют в 35 мл фосфатного буфера, pH 7,4. Раствор готовят непосредственно перед исследованиями;

13,8 ммоль/л раствор пероксида водорода. На титрование такого раствора должно идти 6,96 мл 1 н. раствора $KMnO_4$. По результатам титрования раствор пероксида водорода доводят водой до необходимой концентрации;

10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды;

0,3 моль/л фосфатный буфер, pH 8,0: 10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл воды, 34,2 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ в 500 мл воды, под контролем pH-метра растворы смешивают до необходимого pH;

10,0 ммоль/л раствор Эллмана: 39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга рефрижераторная; баня водяная; холодильник бытовой; весы аналитические; секундомер; pH-метр; колбы мерные; пробирки химические и центрифужные; пипетки измерительные.

Ход определения. В химические пробирки наливают по 0,5 мл гепаринизированной крови и добавляют по 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 10—15 мин для более полного гемолиза. В другие химические пробирки вносят по 1 мл раствора глутатиона и прибавляют по 1 мл гемолизата. Затем по 0,5 мл смеси переносят в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37 °С

и инкубируют в течение 5 мин. В первую пробирку (опытную) добавляют 0,1 мл раствора пероксида водорода, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане. Ровно через 1 мин после этого (по секундомеру) в опытные и контрольные пробы приливают по 2 мл холодного 10%-ного раствора ТХУ. В контрольные пробирки только после этого добавляют 0,1 мл раствора H_2O_2.

Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 мин в холодильник. Затем пробирки центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ и 0—4 °С в течение 15 мин. По 0,5 мл надосадочной жидкости из опытной и контрольной пробирок переносят в химические пробирки и приливают в них по 10 мл фосфатного буфера, pH 8,0. В обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Эллмана, содержимое тщательно перемешивают.

Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

Для определения скорости неферментативного окисления восстановленного глутатиона исследуют пробы, в которые вместо гемолизата прибавляют 1 мл воды (далее как описано выше) (см. с. 177).

Расчет активности глутатионпероксидазы крови проводят по формуле

$$A = \frac{(E_o - E_к) \cdot 10{,}55 \cdot 10^6 \cdot 166{,}4}{13100},$$

где A — активность фермента, МЕ [мкмоль восстановленного глутатиона/л · мин]; E_o — оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона; $E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы по сравнению с опытной при неферментативном окислении глутатиона; 10,55 — конечный объем пробы; 10^6 — пересчет в мкмоли; 166,4 — фактор разведения; 13 100 — коэффициент малярной экстинкции тионитрофенильного аниона (ТНФА), образующегося после окисления 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты, входящего в состав раствора Эллмана.

Примечания. 1. Исследование необходимо проводить возможно быстрее после взятия крови. 2. Реактив Эллмана необходимо приливать к буферу после внесения в него супернатионата как можно быстрее.

Клиническое значение. Глутатионпероксидазе принадлежит ведущее место в ферментативном звене антиоксидантной защиты организма. Она катализирует превращение пероксида водорода и органических пероксидов до гидросоединений, которые в дальнейшем могут метаболизироваться клеточными системами. В одной молекуле фермента содержится четыре атома селена. В организме животных обнаружена глутатионпероксидаза (ГПО-2), не содержащая селена, которая имеет субстратное родство только к органическим пероксидам. Селенсодержащая глутатионпероксидаза (ГПО-1) предотвращает продолжение процесса ПОЛ, обезвреживая уже образовавшиеся гидропероксиды жирных кислот, и одновременно предупреждает их образование. Под ее влиянием восстановленный глутатион реагирует с пероксидом водорода и пре-

вращается в окисленный, который при участии фермента глутатионредуктазы вновь переходит в восстановленный. Активность глутатионпероксидазы зависит не только от интенсивности процесса ПОЛ, но и от обеспеченности организма селеном: нормально сбалансированные по селену рационы поддерживают активность фермента на стабильно высоком уровне. Недостаток, наоборот, снижает его активность. В среднем активность глутатионпероксидазы в крови животных колеблется от 8 до 20 мкмоль G-SH/л · мин · 10^3.

Источники: 11,41.

Определение активности глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) в крови. Принцип. Глутатионредуктаза (ГР), используя восстановленные формы пиридиннуклеотидов, переводит окисленную форму глутатиона в восстановленную. По степени увеличения количества восстановленного глутатиона в среде инкубации рассчитывают активность фермента.

Реактивы: 0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4. 6,8 г KH_2PO_4 растворяют в 500 мл дистиллированной воды, 11,4 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — в 500 мл воды и смешивают полученные растворы под контролем pH-метра до получения необходимого pH;

4,0 ммоль/л раствор окисленного глутатиона. 134,75 мг окисленного глутатиона и 0,5 мг ЭДТА-Na растворяют в 55 мл фосфатного буфера, pH 7,6. Раствор готовят в день исследований;

5,35 ммоль/л раствор НАДФ · H_2. 11,16 мг НАДФ · H_2 растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды. Раствор готовят перед использованием;

10 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты: 10 г ТХУ растворяют в 90 мл дистиллированной воды;

0,3 моль/л раствор фосфатного буфера, pH 8,0. 10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл дистиллированной воды, 34,2 г $K_2HPO_4 \times \times 3H_2O$ — в 500 мл воды и смешивают полученные растворы под контролем pH-метра до получения необходимого pH;

10,0 ммоль/л раствор реактива Эллмана: 39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга рефрижераторная; баня водяная; холодильник бытовой; весы аналитические; pH-метр; секундомер; пипетки измерительные; пробирки химические и центрифужные; колбы мерные.

Ход определения. В химические пробирки наливают по 0,5 мл крови и добавляют по 3,5 мл дистиллированной воды, тщательно перемешивают и ставят в холодильник на 10—15 мин для полного гемолиза. В такие же пробирки вносят по 2 мл раствора окисленного глутатиона, прибавляют по 1 мл гемолизата крови и хорошо перемешивают. По 1 мл полученной смеси переносят в две центрифужные пробирки, помещают их в водяную баню при 37 °С и инкубируют в течение 5 мин. В опытную пробирку добав-

ляют 0,1 мл раствора НАДФ · H_2, интенсивно встряхивают и оставляют в водяной бане. Ровно через 10 мин (по секундомеру) в опытную и контрольную пробирки приливают по 1 мл холодного 10%-ного раствора ТХУ. В контрольную пробирку только после этого добавляют 0,1 мл раствора НАДФ · H_2. Обе пробирки встряхивают и помещают на 10 мин в холодильник. Пробы центрифугируют в течение 15 мин при 3000 $мин^{-1}$ и 0—4 °С.

По 1 мл надосадочной жидкости из контрольной и опытной пробирок переносят в отдельные химические пробирки и приливают по 5 мл фосфатного буфера, pH 8,0. Затем в обе пробирки прибавляют по 0,05 мл реактива Эллмана и содержимое тщательно перемешивают.

Измеряют оптическую плотность контрольной пробы по сравнению с опытной в кювете с ходом луча 10 мм при 412 нм.

Расчет активности ГР производят по формуле

$$A = \frac{E \cdot 6{,}05 \cdot 10^6 \cdot 84}{13100 \cdot 10 \cdot 2},$$

где A — активность фермента, мкмоль окисленного глутатиона/л · 5 мин, E — оптическая плотность; 6,05 — конечный объем пробы; 10^6 — коэффициент пересчета в мкмоль/л; 84 — фактор разведения крови; 13 100 — коэффициент малярности экстинкции ТНФА; 10 — время инкубации, мин; 2 — коэффициент пересчета на окисленный глутатион.

Клиническое значение. Наибольшая активность ГР обнаружена в почках, тонком кишечнике, эритроцитах. Играет важную роль в поддержании достаточного уровня восстановленного глутатиона (GSH) из окисленной его формы (GSSG), что позволяет обеспечить функционирование глутатионзависимых антипероксидантных систем. В качестве донора водорода для восстановления окисленного глутатиона главным образом используется НАДФ, но может быть использована и НАДН. Активность ГР существенным образом зависит от обеспеченности рибофлавином.

Повышение активности ГР отмечается на фоне повышения процессов ПОЛ, в частности при хроническом заболевании печени. Активность ГР в крови животных колеблется от 150 до 450 мкмоль окисленного глутатиона/л · мин.

Источники: 11, 37, 41.

Определение восстановленного глутатиона в крови. Принцип. Сульфгидрильная группа восстановленного глутатиона вступает в реакцию с 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислотой (реактив Эллмана), в результате чего в эквимолярных количествах образуется окрашенный в желтый цвет тионитрофенильный анион (ТНФА), имеющий максимум поглощения при 412 нм.

Реактивы: 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);

0,3 моль/л фосфатный буфер, pH 8,0: 10,2 г KH_2PO_4 растворяют в 250 мл дистиллированной воды и 34,2 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — в

500 мл дистиллированной воды. В раствор двузамещенного фосфорнокислого калия под контролем pH-метра приливают раствор однозамещенного фосфорнокислого калия до установления pH 8,0;

10,0 моль/л раствор реактива Эллмана: 39,6 мг 5,5-дитио-бис-(2-нитробензойной) кислоты растворяют в 10 мл абсолютного метилового спирта.

Оборудование: спектрофотометр; центрифуга рефрижераторная; весы аналитические; холодильник бытовой; пипетки измерительные; пробирки центрифужные и химические.

Ход определения. В химические пробирки наливают по 0,5 мл гепаринизированной крови, 3,5 мл дистиллированной воды и хорошо перемешивают для лучшего гемолиза. Затем по 2 мл разведенной в 8 раз крови переносят в центрифужные пробирки и приливают к ним по 1 мл 20%-ного раствора ТХУ. Пробы тщательно перемешивают и оставляют в холодильнике на 15—20 мин. Затем их центрифугируют 15 мин при 3000 $мин^{-1}$ и температуре 0—4 °С.

В две химические пробирки наливают по 0,5 мл фосфатного буфера и в каждую добавляют по 1 мл надосадочной жидкости. В опытную пробирку приливают 0,05 мл раствора Эллмана, а в контрольную — 0,05 мл метанола. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Измеряют оптическую плотность обеих проб против фосфатного буфера в 10-миллиметровой кювете при длине волны 412 нм.

Концентрацию восстановленного глутатиона рассчитывают по формуле

$$C = \frac{E_о - E_к}{13{,}1 \cdot 10^3} \cdot 72{,}6 \cdot 10^3,$$

где C — содержание восстановленного глутатиона, ммоль/л; $E_о$ — оптическая плотность опытной пробы; $E_к$ — оптическая плотность контрольной пробы; $13{,}1 \cdot 10^3$ — коэффициент малярной экстинкции ТНФА при 412 нм; $72{,}6 \cdot 10^3$ — фактор разведения.

Примечания. 1. Исследование крови необходимо проводить в максимально короткие сроки после ее взятия. 2. Реактив Эллмана следует приливать к буферу как можно быстрее после внесения в него надосадочной жидкости.

Клиническое значение. Глутатион представляет собой серосодержащий триплет, состоящий из трех аминокислот — глутаминовой, цистина и глицина. Содержится во всех живых организмах и играет важную роль в окислительно-восстановительных реакциях. В организме он присутствует главным образом в восстановленной форме (G-SH), тогда как на долю окисленной формы (G-SS-G) приходится 1—3 % общего его содержания. Глутатион — главный фонд мобильных сульфгидрильных групп, а также он участвует в транспорте аминокислот, обмене дисульфидов и поддержании сульфгидрильных групп белков в восстановленном со-

стоянии. Как серосодержащее соединение глутатион участвует в реакции с гидропероксидами без участия каких-либо ферментов или катализаторов. Может ингибировать ПОЛ на уровне инициирования цепного процесса и способен реагировать со свободными радикалами так же активно, как α-токоферол.

Содержание восстановленного глутатиона в крови животных колеблется от 0,4 до 0,7 ммоль/л, в том числе у кур от 0,6 до 0,8 ммоль/л. На уровень глутатиона в крови влияет обеспеченность животных серосодержащими аминокислотами и серой. Его повышение в крови свидетельствует о выраженной защитной и детоксирующей силе организма.

Источники: 11, 17.

Определение витамина *Е* в сыворотке крови **(см. с. 195).**

Определение церулоплазмина в сыворотке крови. Принцип. Метод основан на регистрации оптической плотности при 520 нм окрашенных продуктов, образующихся при ферментативном окислении церулоплазмином солянокислого парафенилендиамина.

Реактивы: 0,4 моль/л ацетатный буфер, pH 5,5. 54,4 г натрия ацетата ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$) растворяют в 900 мл дистиллированной воды, доводят pH до 5,5 под контролем pH-метра концентрированной уксусной кислотой и объем доводят водой до 1 л. Хранят в холодильнике несколько месяцев;

1,5%-ный раствор калия роданида;

буферно-субстратная смесь: 10 мг парафенилендиамина гидрохлорида растворяют в 20 мл ацетатного буфера, pH 5,5. Готовят в день проведения анализов;

10 ммоль/л раствор бензохинона. 10,8 мг бензохинона, высушенного в эксикаторе до постоянной массы, растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Оборудование: спектрофотометр или ФЭК; баня водяная; секундомер; весы аналитические; пробирки химические; пипетки с делениями разные.

Ход определения. В две пробирки вносят по 0,1 мл сыворотки крови, приливают по 1 мл буферно-субстратной смеси и инкубируют в водяной бане при 37 °С в течение 5 мин. Не вынимая пробирок из водяной бани, в одну из них (контрольную) приливают 2 мл охлажденного до 0—4 °С раствора калия роданида. Ровно через 10 мин (по секундомеру) приливают во вторую (опытную) пробирку 2 мл охлажденного раствора калия роданида и обе пробирки вынимают из бани.

Измеряют оптическую плотность опытной пробы против контрольной на спектрофотометре при 530 нм в кюветах с ходом луча 10 мм или на ФЭКе с зеленым фильтром.

Для построения калибровочного графика из свежеприготовленного раствора бензохинона концентрацией 10 ммоль/л готовят разведения стандартных растворов в интервале концентраций от 0,5 до 5,0 ммоль/л. Затем к 0,1 мл каждого стандартного раствора

добавляют по 1 мл буферно-субстратной смеси и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. После этого в пробы добавляют по 2 мл раствора калия роданида и измеряют оптическую плотность при 530 нм на спектрометре или ФЭКе. В качестве раствора для сравнения используют смесь из 0,1 мл воды, 1 мл ацетатного буфера и 2 мл раствора калия роданида. На бумаге с миллиметровыми делениями строят калибровочную кривую, откладывая по оси абсцисс значения концентраций стандартных растворов, а по оси ординат — соответствующие им значения оптической плотности.

Ферроксидазную активность церулоплазмина рассчитывают по формуле

$$A = X/t,$$

где A — активность церулоплазмина, мкмоль/л бензохинона/л · мин; X — количество бензохинона, найденное по калибровочной кривой, ммоль/л; t — разница времени инкубации контрольной и опытной проб, мин (10 мин).

Примечания. 1. Сыворотка крови должна быть без гемолиза.
2. Сыворотку можно хранить в течение 1 нед при температуре 0—4 °С.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Церулоплазмин (ферроксидаза КФ 1.16.3.1) — медьсодержащий белок, который в крови, подобно супероксиддисмутазе (СОД), катализирует реакцию дисмутации (превращения) свободнорадикальных форм кислорода (O_2^-), предохраняя таким образом от их повреждающего действия липосодержащие биоструктуры. И хотя эффективность церулоплазмина в отношении связывания супероксиданиона оценивают примерно в 100 раз ниже, чем у СОД, в настоящее время он рассматривается в качестве основного антиоксиданта плазмы крови. Как белок церулоплазмин обладает высокой стабильностью к токсическому действию супероксидов даже в условиях интенсивной генерации активных форм кислорода. Церулоплазмин обладает как специфической, так и неспецифической антиоксидантной активностью.

Клинические наблюдения показывают, что содержание церулоплазмина возрастает при хроническом холестатическом гепатите (в 1,8 раза) и при первичном билиарном циррозе (в 2 раза), тогда как активность СОД в этих случаях снижается на 23—25 %.

У здоровых животных содержание в крови церулоплазмина колеблется от 150 до 550, в том числе у кур от 50 до 120 мкмоль бензохинона/л · мин.

Источники: 3, 11, 70.

Определение антиокислительной активности (АОА) плазмы крови. П р и н ц и п. Метод основан на регистрации скорости окисления восстановительной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола (2,6-ДХФИФ) кислородом, растворенным в реакционной среде. При этом бесцветная лейкоформа 2,6-ДХФИФ переходит в окрашенную форму, имеющую максимум поглощения при 600 нм.

Р е а к т и в ы: 0,25 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4. 7,8 г $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, растворяют в 100 мл дистиллированной воды и

11,4 г $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — в 100 мл дистиллированной воды. К 81 мл второго раствора приливают 19 мл первого раствора и устанавливают нужное значение pH с помощью pH-метра. Затем раствор доводят до 200 мл дистиллированной водой;

0,8 ммоль/л водный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в окисленной форме. Для этого 11,6 мл 2,6-ДХФИФ растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед анализами.

3,2 ммоль/л раствор закисного сернокислого железа. 44,5 г $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Раствор готовят непосредственно перед анализами.

Оборудование: спектрофотометр с термостатируемой кюветой или спектрофотометр «Спекол» с термостатируемой кюветой; ультратермостат; баня водяная; весы аналитические; колбы мерные; пипетки измерительные; микропипетки или микрошприц на 10 и 20 мкл.

Ход определения. В термостатируемую кювету последовательно добавляют 0,5 мл фосфатного буфера (pH 7,4), 0,15 мл раствора 2,6-ДХФИФ, 0,15 мл раствора закисного сернокислого железа и быстро перемешивают. Все растворы должны иметь температуру 37 °С. Сразу после перемешивания быстро добавляют 10 или 20 мкл плазмы крови, перемешивают и через каждые 30 с (по секундомеру) после добавления плазмы на протяжении 5 мин измеряют оптическую плотность при 600 нм против воды ($D_{5оп}$).

Определяют оптическую плотность при 600 нм инкубационной среды, в которой 2,6-ДХФИФ окислен полностью. Для этого в кювету добавляют те же компоненты, но вместо раствора $FeSO_4$ и пробы добавляют равные им объемы дистиллированной воды ($D_{макс}$).

Расчет результатов начинают с определения констант скоростей окисления 2,6-ДХФИФ в контроле ($K_{контр}$) и опыте ($K_{оп}$) по формулам

$$K_{контр} = \frac{\ln D_{max} - \ln(D_{max} - D_{5к})}{5} \text{ и } K_{оп} = \frac{\ln D_{max} - \ln(D_{max} - D_{5оп})}{5},$$

где ln — логарифм натуральный (положительный).

Рассчитывают константу ингибирования ($K_и$) плазмой крови окисления 2,6-ДХФИФ, являющуюся показателем ее антиокислительной активности по формуле

$$K_и = \frac{K_к - K_{оп}}{C},$$

где $K_и$ — антиокислительная активность плазмы крови, мл · мин$^{-1}$; $K_к$ — константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в контроле; $K_{оп}$ — константа скорости окисления 2,6-ДХФИФ в опыте; C — концентрация плазмы в инкубационной смеси, мг/л.

Примечания. 1. Плазма крови должна быть без гемолиза. 2. Исследование должно проводиться не позднее 6 ч после взятия крови.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. АОА крови свидетельствует о суммарной защите организма от токсичных для структур клеточных мембран и функциональной активности белков — ферментов продуктов ПОЛ. Повышение АОА крови свидетельствует о высокой способности организма противостоять воздействию факторов, активизирующих свободнорадикальное окисление липидов; снижение, наоборот, указывает на уменьшение его антиокислительной защиты.

Антиокислительная активность плазмы крови у животных колеблется от 0,8 до 2,5, в том числе у кур от 0,2 до 0,5 л × мин$^{-1}$ · 10^{-3}.

Источник: 11.

3.3.9. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ

Для контроля за обеспечением животных витаминами, своевременной диагностики гиповитаминозов анализируют не только обеспеченность витаминами рационов, но и определяют их содержание в крови, молозиве, молоке, печени и других тканях, а также используют косвенные показатели. При изучении обмена витаминов применяют биологические, химические, физико-химические, изотопные и другие методы. Содержание витаминов в биологических субстратах чаще определяют с помощью колориметрических, спектрофотометрических, спектрофлуориметрических и газохроматографических методов. Из-за сложности методов прямое определение концентрации многих витаминов в крови и других биологических субстратах проводится редко.

Определение витамина А и каротина в сыворотке крови по Бессею в модификации В. И. Левченко и сотр. П р и н ц и п. Метод основан на щелочном гидролизе и экстракции витамина А и каротина из сыворотки крови, молозива (молока) малолетучими растворителями и последующем спектрофотометрическом измерении поглощения света раствором (при длине волны 328 нм для витамина А и 460 нм для каротина) до и после разрушения витамина А ультрафиолетовыми лучами.

Р е а к т и в ы: раствор калия гидроксида 1 моль/л в 96%-ном этиловом спирте. К 5,6 г КОН добавляют 6 мл дистиллированной воды, растворяют и доводят объем до 100 мл этанолом, тщательно перемешивают (или берут 1 объем 1 н. КОН и 10 объемов 96%-ного этанола). Реактив готовят перед работой;

ксилол-октановая смесь (1 : 1, х. ч.). В необходимых случаях ксилол перегоняют. Реактив готовят за несколько часов до начала анализа.

Оборудование: спектрофотометр СФ-46, СФ-16 или фотоэлектроколориметр КФК-2, КФК-3; ртутно-кварцевая лампа ДРТ-400; вентилятор настольный; водяная баня; пробирки из стекла «пирекс», пропускающие ультрафиолетовые лучи с притертыми пробками (55 · 8 мм); пипетки с резиновыми баллончиками или со шприцем для отсасывания жидкости.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 2 мл сыворотки крови (молозива) и 1 моль/л спиртового раствора КОН, перемешивают тонкой стеклянной палочкой до образования однородной смеси и ставят для гидролиза в водяную баню на 20 мин при 60 °С (через каждые 10 мин перемешивают). После гидролиза пробирки охлаждают в течение 10 мин в морозильной камере холодильника. В каждую из них вносят по 4 мл ксилол-октановой смеси, закрывают пробками, интенсивно встряхивают в течение 2—3 мин, снова охлаждают 5—7 мин, а затем центрифугируют 10—15 мин при 3000 мин$^{-1}$. Верхний слой, который содержит экстракт витамина А и каротиноидов в ксилол-октановой смеси, отбирают пипеткой в пробирки из стекла «пирекс».

Фотометрию проводят в кювете с толщиной слоя 10 мм, а для контроля используют ксилол-октановую смесь. На СФ-46 каротин определяют при длине волны 460 нм, ретинол — при 328 нм; на КФК-2 или КФК-3 при длине волн соответственно 440 и 315 нм.

Оптическую плотность смеси для определения витамина А проводят до и после обработки пробирок ультрафиолетовыми лучами в течение 50 мин. Для этого пробирки из стекла «пирекс» плотно закрывают притертыми стеклянными пробками и ставят на расстояние 15—20 см от лампы ДРТ-400 или ПРК-5. Для охлаждения пробирок тотчас включают два настенных вентилятора. По разнице оптической плотности смеси, полученной при фотометрии до и после облучения ультрафиолетовыми лучами, находят концентрацию витамина А в сыворотке крови (молозиве).

Расчет ведут при определении витамина А на СФ-16 или СФ-46 по формуле

$$A = (E_1 - E_2) \cdot 1274,$$

а при определении на КФК-2 или КФК-3 по формуле

$$A = (E_1 - E^2) \cdot 1500,$$

где A — концентрация витамина А, мкг/100 мл; E_1 — экстинкция раствора до воздействия волной 315 нм; E_2 — экстинкция раствора после воздействия волной 315 нм; 1274 и 1500 — коэффициенты для определения витамина А.

Концентрация каротина при определении на СФ-16 или СФ-46 равна $E \cdot 762$, а при определении на КФК-2 или КФК-3 — $E \cdot 850$,

где E — экстинкция раствора при воздействии длины волны 440 нм; 762 и 850 — коэффициенты для определения каротина.

Источники: 8, 20, 21.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Основными формами витамина А является витамин А-спирт (ретинол) и его производные в форме сложного эфира (ретинолпальмитата) с пальмитиновой кислотой. Главный источник витамина А в организме животных — каротин. Усвоение его и витамина А происходит в кишечнике, при этом принято считать, что усваивается только 1/3—1/4 часть каротина и около 1/7 части его превращается в витамин А. 25—50 % витамина А переходит в печень.

В условиях полноценного белкового питания, хорошей обеспеченности витамином B_{12}, а также использования антиоксидантов повышается активность каротиндиоксигеназы, увеличивается количество молекул каротина, расщепляющихся по центру, в 1,5—2 раза возрастает эффективность синтеза витамина А.

Действие витамина А проявляется в обеспечении нормального роста и развития животных, дифференцировании эпителиальной и костной тканей, регуляции обмена веществ.

Содержание витамина А в сыворотке крови у клинически здоровых телят 5—10-дневного возраста составляет 9—15 мкг/100 мл, у телят месячного возраста 12,5—25; у 3-месячных — 15—35; у молодняка старше 3-месячного возраста 30—80; у коров в стойловый период 25—80, в пастбищный период 40—150; у свиней 20—50; у овец и лошадей 15—25 мкг/100 мл. В молозиве коров первого удоя в стойловый период содержится 140—500 мкг/100 мл витамина А, в пастбищный период 150—580 мкг/100 мл, в молоке соответственно 30—80 и 80—210 мкг/100 мл. В желтке куриных яиц — 6—75 мкг/г.

Снижение количества витамина А в крови, печени, молозиве и молоке отмечают при недостатке каротина и витамина А в кормах, плохом усвоении их вследствие хронических заболеваний органов пищеварения и печени. При снижении в крови витамина А ниже 10 мкг%, а в печени ниже 50 мкг% у взрослых животных появляются симптомы гиповитаминоза, задерживается спермогенез, сперматозоиды становятся малоподвижными, теряют оплодотворяющую способность, нарушается строение и функция эпителия органов дыхания, пищеварения, репродуктивная способность самок, появляются респираторные болезни и др.

Определение каротина в сыворотке (плазме) крови по Кари и Прейсу в модификации Юдкина. П р и н ц и п. Извлечение каротина из белков сыворотки (плазмы) крови производится петролейным эфиром или авиационным бензином. Экстинкции экстракта каротина измеряются на фотоэлектроколориметре. Расчет ведут по стандартному раствору калия двухромовокислого.

Р е а к т и в ы: петролейный эфир (ч.) или авиационный бензин марки Б-70;

96%-ный спирт этиловый;

основной калибровочный раствор. 360 мг калия двухромовокислого растворяют в мерной колбе на 500 мл небольшим количеством дистиллированной воды и затем доводят до метки;

рабочий калибровочный раствор. Готовят перед анализом. Смешивают 2,4 мл основного калибровочного раствора и 2,6 мл дистиллированной воды. Приготовленный рабочий калибровочный раствор соответствует интенсивности окраски 1 мг% концентрации каротина.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; стеклянные палочки.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки (плазмы) крови, 3 мл 96%-ного этилового спирта, перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Верхний слой (этиловый спирт) сливают, к осадку добавляют 5 мл эфира, тщательно перемешивают стеклянной палочкой в течение 2 мин. Снова центрифугируют 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Эфир с экстракцией каротина сливают в пробирку и фотометрируют при синем светофильтре (длина волны 400—500 нм) в кювете с толщиной слоя 1 см против воды. Параллельно фотометрируют рабочий калибровочный раствор калия двухромовокислого, соответствующий по окраске 1 мг% каротина.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{E_{пр}}{E_к} \cdot 1{,}0,$$

где x — количество каротина, мг%; $E_{пр}$ — экстинкция испытуемого образца; $E_к$ — экстинкция калибровочного рабочего раствора; 1,0 — коэффициент для пересчета в мг%.

Примечание. Уровень каротина в сыворотке (плазме) крови при хранении снижается, что следует учитывать при проведении анализов.

Источник: 39.

Клиническое значение. Каротин — основной источник витамина А. Для клинических целей каротин определяют в сыворотке (плазме) крови крупного рогатого скота с 3-месячного возраста. У телят молочного периода его содержание в сыворотке крови очень низкое, поэтому анализы не имеют практического значения. У свиней, лошадей, овец и коз каротин в пищеварительном тракте всасывается только в трансформированной в витамин А форме, т. е. каротин через стенку кишечника не проникает, поэтому в крови, печени и молоке этих животных каротин не обнаруживают или находят следовые концентрации.

Концентрация каротина в крови крупного рогатого скота составляет в пастбищный период 1—2,8 мг%, в стойловый период 0,4—1,0 мг%. Снижение каротина наблюдается при дефиците его в кормах, плохом усвоении вследствие болезней желудочно-кишечного тракта, гепатитах и гепатозах, недостатке в рационах белка и легкоусвояемых углеводов, витамина B_{12}, разрушении каротиноидов вследствие порчи кормов, различных токсикозах, включая нитратные.

Флуориметрический метод определения общего тиамина в крови и печени (по Г. Д. Елисеевой). Принцип. Метод основан на окислении тиамина в тиохром, экстракции последнего в органический растворитель и измерении интенсивности флуоресценции.

Реактивы: калибровочный раствор тиамина. 100 мг тиаминхлорида растворяют в 100 мл 0,01 н. соляной кислоты. Хранят в холодильнике до 1 мес. Рабочий раствор готовят в день определения разведения стандартного раствора в 1000 раз, получают раствор с содержанием тиамина 1 мкг/мл;

2%-ный раствор калия железосинеродистого [$K_2Fe(CN)_6$] — красной кровяной соли, свежеприготовленный;

30%-ный раствор натрия гидроксида;

96%-ный спирт этиловый;

0,25моль/л раствор хлористоводородной кислоты;

изо-бутиловый (изо-амиловый) спирт, насыщенный водой;

20%-ный раствор натрия карбоната (Na_2CO_3);

20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

фосфатаза щелочная лиофильная;

универсальный индикатор или 0,04%-ный спиртовой раствор бромкрезоловый пурпуровый.

Для того чтобы спирты (изобутиловый, изоамиловый, этиловый) не флуоресцировали, их очищают путем взбалтывания с активированным углем и последующего фильтрования до полного отсутствия сине-голубого свечения на флуориметре.

Оборудование: флуориметр типа ЭФ-3; термостат; водяная баня; ступки фарфоровые; стаканчики сахарные (Хагедорна); цилиндры на 100 мл с притертыми пробками; делительные воронки; пипетки; пробирки центрифужные без деления и с делением.

Ход определения. В стаканчик Хагедорна или большую пробирку вносят 1 мл оксалатной крови (2—3 мг оксалата на 1 мл крови), 10 мл 0,25 моль/л соляной кислоты и нагревают в кипящей водяной бане в течение 15 мин для частичного разрушения флуоресцирующих примесей. К теплому раствору при взбалтывании прибавляют по каплям 20 %-ный раствор натрия карбоната до получения pH 5,2 (по универсальному индикатору или по 0,04 %-ному раствору бромкрезолпурпура). Затем добавляют 2—3 капли хлороформа, 50 мг фосфатазы и перемешивают стеклянной палочкой. Стаканчик закрывают ватной пробкой и выдерживают в термостате 24 ч при 37 °С для ферментативного расщепления кокарбоксилазы.

По истечении этого времени смесь нагревают в течение 3 мин на кипящей водяной бане. Затем через фильтр, предварительно отмытый от флуоресцирующих веществ горячей бидистиллированной водой, раствор фильтруют в чистый стаканчик Хагедорна. Остающийся при этом на фильтре осадок во избежание потери тиамина промывают с добавлением 3 мл горячей бидистиллированной воды. Смесь после нагревания можно центрифугировать при 3000 $мин^{-1}$ в течение 10—15 мин.

К полученному желтоватому раствору прибавляют 2 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения остальной части белков. Смесь нагревают на водяной бане при 40—50 °С в течение 10 мин, после чего снова фильтруют через другой отмытый фильтр в делительную воронку. Остаток на фильтре, как и в первый раз, промывают 3 мл горячей бидистиллированной воды. К фильтрату добавляют двойной объем изоамилового спирта. Смесь энергично встряхивают 2 мин для извлечения мешающих определению тиамина примесей и оставляют до разделения слоев (примерно на 2 ч). Верхний слой — изоамиловый спирт с посторонними флуоресцирующими веществами отбрасывают. Центрифугируют при 3000 мин$^{-1}$ в течение 15 мин. Нижний, водный, слой делят на две равные части, разливая в делительные воронки (или большие пробирки). Одна служит опытом, другая — контролем.

В опытную пробу вносят смесь, состоящую из 2 мл 1%-ного раствора красной кровяной соли (калия железистосинеродистого) и 2 мл 30%-ного раствора натрия гидроксида (смесь готовят перед применением и выдерживают 2 мин). В контрольную пробу добавляют 2 мл 30%-ного раствора натрия гидроксида. В обе делительные воронки с приготовленными таким образом растворами приливают по 8 мл изоамилового спирта. Смесь встряхивают 2 мин, при этом тиохром извлекается изоамиловым спиртом. После разделения слоев (через 6—24 ч) отбрасывают теперь уже нижний, водный, слой, а верхний промывают добавлением 4 мл бидистиллированной воды с последующим встряхиванием и отстаиванием. После отстаивания нижний, водный, слой отбрасывают, а верхний переносят в мерную пробирку, доливают изоамиловым спиртом до 8 мл (если есть помутнение, то прибавляют еще 1 мл 96%-ного этилового спирта для просветления) и флуориметрируют.

Одновременно точно так же, как опытные пробы, обрабатывают калибровочный раствор тиамина с содержанием 1 мкг в 1 мл.

Флуориметрия. Настраивают флуориметр по калибровочному раствору тиамина путем регулирования светового потока до тех пор, пока стрелка гальванометра не покажет величину, выбранную для калибровочного раствора (обычно на делении 40 или 80). Используют флуориметр, снабженный чувствительным гальванометром, специфическим светофильтром с максимумом поглощения около 390 нм и одинаковыми пробирками или кюветами из нефлуоресцирующего стекла. В каждую из взятых пробирок вносят около 8 мл испытуемых окисленных и неокисленных изоамиловых растворов (опыт и контроль), а также изоамиловые растворы окисленного и неокисленного калибровочного раствора тиамина и определяют интенсивность флуоресценции по шкале гальванометра.

Расчет количества общего тиамина ведут по формуле

$$x = \frac{(A - B)K}{H} \cdot 100,$$

где x — содержание тиамина в 100 мл крови, мкг%; A — показатель гальванометра для опытной пробы; B — показатель гальванометра для контрольной пробы; K — цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы, мкг тиамина; H — количество крови, взятой в опытную пробу, мл; 100 — коэффициент для перевода в проценты.

Ход определения общего тиамина в печени. Навеску печени массой 3 г растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком, приливают 15 мл 0,25 моль/л раствора кислоты хлористоводородной, размешивают и выливают в стаканчик Хагедорна или в большую пробирку. Ступку промывают еще 5 мл 0,25 моль/л раствора кислоты хлористоводородной и выливают в тот же стаканчик. Исследование проводят, как описано в методике определения общего тиамина в крови.

Расчет проводят по формуле

$$x = \frac{(A - B)K}{H},$$

где x — содержание тиамина, мкг/г; A — показатель гальванометра для опытной пробы; B — показатель гальванометра для контрольной пробы; K — цена одного деления шкалы гальванометра при данном режиме работы; H — масса навески ткани, г.

Источник: 75.

Клиническое значение. Тиамин животным поступает с кормом в свободном, этерифицированном и связанном видах. В кровь в основном попадает свободный тиамин, который фосфорилируется в печени. Часть его в виде свободного тиамина поступает в общий кровоток и распределяется по другим тканям. В тканях основная масса тиамина фосфорилируется до тиаминдифосфата (ТДФ), который является коферментной формой витамина B_1. ТДФ катализирует реакции окислительного декарбоксилирования α-кетокислот, участвуя таким образом в процессе аэробного окисления углеводов, взаимопревращения аминокислот. Недостаток тиамина сопровождается торможением процесса распада пировиноградной кислоты и накоплением ее в крови и моче.

О степени обеспеченности организма тиамином судят по его содержанию в крови, моче, печени, а также по содержанию в крови и моче пировиноградной кислоты. В крови, тканях и других биологических объектах постоянно присутствует сам тиамин и его производные: ТДФ, тиаминмонофосфат (ТМФ), тиохром. В крови в основном содержится фосфорилированный тиамин (ТДФ и др). Свободного тиамина в крови очень мало (0,3—0,9 мкг%), поэтому для клинических целей исследуют общий тиамин. Однако при заболеваниях почек целесообразно определять в крови и моче также и свободный тиамин.

Содержание общего тиамина в крови колеблется в пределах 7—15 мкг%, в печени 8—13 мкг/г. При этом в плазме крови обна-

руживается преимущественно свободный тиамин, в эритроцитах и лейкоцитах — фосфорилированный. Сезонной зависимости содержания тиамина в крови не обнаружено.

Гиповитаминоз B_1 проявляется при содержании общего тиамина в цельной крови ниже 5—6 мкг%, в печени менее 0,3 мкг/г. Уровень пировиноградной кислоты при этом превышает 0,7—1,2 мг%. В условиях интенсивного выращивания и откорма бычков в промкомплексах при содержании общего тиамина в крови 5 мк% и ниже И. С. Шалатонов (1982) отмечал выраженные признаки алопеции. Низкий уровень тиамина в крови, печени и других тканях наблюдается при цереброкортикальном некрозе. Подавляется бактериальный синтез витамина B_1 в желудочно-кишечном тракте при скармливании животным антибиотиков и аминазина.

Определение общего рибофлавина в крови. Принцип. Метод основан на экстракции различных форм рибофлавина из крови при помощи трихлоруксусной кислоты с последующим кислотным гидролизом флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флуориметрическим определением содержания общего рибофлавина.

Реактивы: 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

4 моль/л раствор калия фосфата двузамещенного (K_2HPO_4);

10%-ный раствор натрия гидросульфита ($NaHS_2O_4$) в 5%-ном растворе натрия гидрокарбоната ($NaHCO_3$). Готовят непосредственно перед употреблением;

калибровочный основной раствор рибофлавина, содержащий 100 мкг в 1 мл. Рабочий калибровочный раствор рибофлавина с содержанием 20 мкг в 1 мл: 10 мл основного раствора разводят до 50 мл дистиллированной водой.

Оборудование: пробирки центрифужные; пипетки на 1 мл; пробирки с притертыми пробками; термостат; флуориметр.

Ход определения. *Первый вариант.* В центрифужную пробирку вносят 2 мл оксалатной крови и 8 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (или 2 мл крови, 3 мл дистиллированной воды и 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты). Тщательно перемешивают стеклянной палочкой, оставляют в темноте на 60 мин. Затем содержимое пробирки снова перемешивают и центрифугируют при 3000 $мин^{-1}$ в течение 30 мин. Прозрачную надосадочную жидкость помещают в термостат при температуре 37—38 °С на 20 ч или при комнатной температуре на 2 сут для гидролиза ФАД. После этого пробирку охлаждают и к 8 мл гидролизата приливают 2 мл 4 моль/л раствора K_2HPO_4, перемешивают и оставляют стоять 1—2 ч в темноте для нейтрализации. Затем измеряют флуоресценцию при помощи флуориметра с первичным светофильтром, имеющим максимум поглощения около 420 нм, и со вторичным — с максимумом поглощения около 560 нм.

Для измерения нейтрализованный раствор вносят в кювету флуориметра и делают первый замер интенсивности флуоресценции

(P_1). Затем сливают из кюветы испытуемую жидкость обратно в пробирку и добавляют туда 0,1 мл рабочего калибровочного раствора рибофлавина (0,1 мл содержит 2 мкг рибофлавина) и получают раствор, содержащий 0,2 мкг в 1 мл. Полученный раствор снова замеряют на флуориметре и получают второй замер (P_2). После этого гасят флуоресценцию, приливая 0,5 мл 10%-ного раствора $NaHS_2O_4$. Сразу после добавления этого раствора во избежание частичного обратного окисления рибофлавина производят третий замер (P_3).

Расчет содержания рибофлавина (x) ведут по формуле

$$x = \frac{\text{Количество мкг рибофлавина в 1 мл стандарта} - (P_1 - P_3^*)}{\text{Количество мл крови} \cdot (P_2^* - P_1)} \cdot 100.$$

Второй вариант. Вытяжку и калибровочный рабочий раствор рибофлавина вносят в две одинаковые пробирки или кюветы и измеряют интенсивность их флуоресценции посредством флуориметра по шкале гальванометра. В обе пробирки прибавляют на кончике шпателя $NaHCO_3$ и $NaHS_2O_4$ (примерно по 0,1 г) для гашения флуоресценции рибофлавина и снова измеряют флуоресценцию.

Расчет содержания рибофлавина ведут по формуле

$$x = \frac{(A - Б) \cdot 20 \cdot VV_2}{BnV_1} \cdot 100,$$

где x — содержание рибофлавина, мкг%; A — показания флуориметра для испытуемого раствора (первый отсчет); $Б$ — показания флуориметра для испытуемого раствора после погашения (второй отсчет); B — показания флуориметра для калибровочного раствора, содержащего 20 мкг в 1 мл; 20 — содержание рибофлавина в 1 мл калибровочного рабочего раствора, мкг; n — количество крови, мл; V — общее разведение, мл; V_1 — фильтрат, взятый на окисление, мл; V_2 — фильтрат после окисления, мл.

Источники: 8, 75.

Клиническое значение. Источник рибофлавина — корма, кроме того, он синтезируется бактериями преджелудков и кишечника. Бактериальный синтез рибофлавина наиболее выражен у жвачных животных, поэтому при рациональном их кормлении они не испытывают недостатка этого витамина. В слизистой оболочке кишечника, в печени и других тканях рибофлавин при участии АТФ фосфорилируется и превращается в активные соединения — коферменты флавин-мононуклеоитид (ФМН) и флавин-адениннуклеотид (ФАД). Оба они участвуют в окислительно-восстановительных процессах в составе дегидрогеназ и оксидаз. ФМН служит коферментом дегидрогеназ, которые катализируют окислительное дезаминирование некоторых аминокислот и других

* В величины P_2 и P_3 вводят поправки на разведение, т. е. умножают на соответствующее разведение.

веществ. ФАД является коферментом дегидрогеназ β-окисления жирных кислот, сукцинаддегидрогеназы, ксантинкиназы и других ферментов.

У здоровых животных в крови 8—15 мкг%, в печени 39,6—46,6 мкг/г общего рибофлавина. Снижение содержания рибофлавина в крови и печени отмечается при недостаточном его поступлении с кормом, даче животным внутрь антибиотиков, аминазина, обладающих антивитаминным действием и подавляющих бактериальный синтез. При гиповитаминозе B_2 уровень рибофлавина в крови телят составляет 6 мкг% и ниже.

Определение токоферолов в плазме крови с α,α'-дипиридилом (2, 2'-дипиридил). Принцип. Метод основан на окислении токоферолов хлорным железом и определении образовавшегося Fe^{2+} в виде окрашенного комплекса с α,α'-дипиридилом, обладающим максимумом поглощения при 520 нм. Поправка на каротиноиды вносится по поглощению при 460 нм. Эфиры токоферолов при их определении гидролизуют КОН в присутствии аскорбиновой кислоты. Свободный токоферол определяют без окисления.

Реактивы: абсолютный этиловый спирт, перегнанный над таблетками калия гидроксида (КОН) и кристаллами калия перманганата ($KMnO_4$). Очистка от альдегидов: этиловый спирт перегоняют над таблетками КОН и кристаллами $KMnO_4$, выбрасывая первую и последнюю фракции (до 10 % общего объема);

концентрированный раствор калия гидроксида (КОН) — 50 г КОН в 50 мл дистиллированной воды;

10%-ный раствор кислоты аскорбиновой в дистиллированной воде. Готовят непосредственно перед опытом и нейтрализуют несколькими каплями концентрированной КОН;

0,3%-ный раствор α,α'-дипиридила в *н*-пропиловом спирте. Сохраняют в склянке из темного стекла;

ксилол очищенный (х. ч.). Препарат встряхивают в делительной воронке с 3—4 порциями концентрированной серной кислоты (H_2SO_4), пока кислотный слой не перестанет окрашиваться, промывают водой, насыщенным раствором перманганата калия, вновь водой до удаления окраски $KMnO_4$, сушат над безводным Na_2SO_4 и перегоняют, отбрасывая первые и последние 10 % отгона;

0,12%-ный раствор $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в абсолютном этиловом спирте. Сохраняют в темной склянке;

D,L-α-токоферол, калибровочный раствор в абсолютном спирте этиловом концентрацией 100 мкг/мл.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; пробирки 18 × 1,5 см с притертыми пробками; пробирки центрифужные; центрифуга.

Ход определения свободного токоферола. К 2 мл плазмы (сыворотки) крови приливают 1 мл дистиллированной воды и 3 мл абсолютного этилового спирта, добавляемого по каплям при перемешивании. Доливают 5 мл ксилола, закрывают

пробкой, интенсивно перемешивают 6 мин и центрифугируют 5—10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Отбирают 3 мл ксилолового экстракта, измеряют его оптическую плотность при длине волны 460 нм (поправка на каротины) против воды, прибавляют 1 мл раствора α,α'-дипиридила в *н*-пропиловом спирте, перемешивают, добавляют 1 мл раствора $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, тщательно перемешивают и точно через 2 мин фотометрируют при длине волны 520 нм против воды. Одновременно таким же образом обрабатывают контроль на реактивы, содержащий вместо плазмы (сыворотки) крови 2 мл воды. Для определения содержания токоферолов рассчитывают оптическую плотность токоферолов по формуле

$$D_e = D_{520} - (D_к + 0{,}217)D_{460},$$

где D_e — оптическая плотность токоферолов; D_{520} — оптическая плотность опытной пробы при 520 нм; $D_к$ — оптическая плотность контрольной пробы при 520 нм; 0,217 — экспериментально определенная поправка на оптическую плотность, обусловленную присутствием каротиноидов; D_{460} — оптическая плотность опытной пробы при 460 нм.

Концентрацию свободного токоферола рассчитывают по калибровочной кривой, для построения которой используют калибровочный раствор D,L-α-токоферола при содержании последнего от 10 до 100 мкг в пробе.

Ход определения суммарного токоферола и его эфиров. В пробирках 18 × 1,5 см с притертыми пробками смешивают 2 мл плазмы (сыворотки) крови, 1 мл 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты, 0,2 мл концентрированной КОН и 3 мл абсолютного спирта. Вносят в пробирки шарики или осколки кварцевого стекла, накрывают их небольшими воронками и помещают на 10 мин в кипящую водяную баню так, чтобы пробирки были углублены в воду на 2 см. Верхнюю часть пробирок охлаждают током воздуха из воздуходува. Через 10 мин пробирки охлаждают холодной водой, добавляют 5 мл ксилола, интенсивно перемешивают 8 мин, центрифугируют 5—10 мин при 3000 мин$^{-1}$ и далее обрабатывают, как описано выше.

Содержание эфиров токоферола рассчитывают по разности между количеством суммарного и свободного токоферола. По данным ряда авторов, содержание свободного токоферола в плазме крови в 6—6,5 раза больше эфиров.

Примечания. 1. Желательно работать в затемненном помещении и проводить фотометрирование через строго определенное время после добавления дипиридила, так как окраска нестабильна. 2. Сыворотку (плазму) крови можно хранить при комнатной температуре в течение 1 сут, при 5 °С 2 нед и при минус 20 °С 2 мес.

Источник: 75.

Определение токоферолов в тканях и сыворотке крови методом колоночной хроматографии. Принцип метода общий для хрома-

тографии. Наиболее удачный адсорбент для удаления примесей — оксид алюминия.

Р е а к т и в ы: 96%-ный этиловый спирт;
абсолютный этиловый спирт; чистый бензол (без тиофена);
концентрированная серная кислота (H_2SO_4);
безводный натрия сульфат;
оксид алюминия для хроматографии, сильно активированный;
петролейный эфир;
углекислота или азот;
0,2%-ный раствор железа хлорного ($FeCl_3$)в абсолютном спирте;
0,5%-ный раствор α,α'-дипиридила в абсолютном спирте;
стандартный раствор токоферола (250 мг D,L-α-токоферола растворяют в мерной колбе ледяной уксусной кислотой до объема 250 мл).

О б о р у д о в а н и е: адсорбционная колонка; фотоэлектроколориметр; колбы; пипетки; пробирки; бюхтеревская воронка; делительная воронка; песочная баня.

Очистка алюминия оксида. 400 г алюминия оксида, используемого в качестве адсорбента, суспензируют в 200 мл концентрированной H_2SO_4, в которой до этого было растворено 20 г цинка хлорида. Добавляют 20 мл дистиллированной воды и ставят колбу в холодильник на 72 ч. Подготовленный таким образом алюминия оксид переносят в бюхтеровскую воронку, промывают обычной водой до нейтральной реакции, затем ацетоном и сушат на воздухе. Отвешивают необходимое количество приготовленного адсорбента и прокаливают его в муфельной печи при температуре 450 °С в течение 6 ч. Перед употреблением влажность алюминия оксида доводят дистиллированной водой до 9 %.

Адсорбционная колонка. Хроматографию проводят в стеклянной трубке диаметром 10 мм, заполненной адсорбентом на высоту 80 мм. Рыхлость слоя должна быть такой, чтобы он пропускал 30 капель за 1 мин. Для предотвращения увлажнения адсорбента сверху насыпают безводный натрия сульфат. Перед началом хроматографии через колонку пропускают чистый петролейный эфир (5—6 мл), регулируя скорость капания.

Х о д о п р е д е л е н и я. 2 мл сыворотки (плазмы) крови вносят в сухую делительную воронку (50 мл), прибавляют 10 мл этилового спирта, смесь энергично встряхивают 3 мин, после чего дважды экстрагируют 10 мл бензола при встряхивании по 3 мин. Объединенный безбелковый экстракт со следами спирта высушивают над безводным натрия сульфатом в защищенном от света месте.

Навеску ткани (1—3 г) гомогенизируют с 20 мл спиртово-бензольной смеси (1 : 1), переносят в круглодонную колбу, закрывают пробкой и экстрагируют в течение 30—40 мин. После этого спиртово-бензольный экстракт фильтруют в делительную воронку и омыляют свежеприготовленным 50%-ным раствором КОН (55 % объема омыляемого вещества). Так как токоферол очень чувстви-

телен к воздействию щелочей и легко ими разрушается, процесс омыления проводят при полном отсутствии кислорода или под защитой антиокислителей. С этой целью в делительную воронку несколько раз вводят CO_2 или высыпают 50—100 мг пирогаллола.

После окончания омыления в делительную воронку добавляют 50 мл дистиллированной воды с 1 мл концентрированной H_2SO_4 для нейтрализации КОН. Тщательно взбалтывают смесь и отделяют бензольную фракцию. Содержимое воронки промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции. Экстракт сушат в колбе над безводным натрия сульфатом. Высушенный бензольный экстракт фильтруют в низком тигле, споласкивая осадок чистым бензолом, и выпаривают досуха на песочной бане при температуре 60 °С.

Хроматография. Неомыленный осадок растворяют в эфире трижды, используя по 5 мл его каждый раз, и наносят на подготовленную адсорбционную колонку. Каротиноиды вымывают петролейным эфиром. Токоферол экстрагируют 5—6 раз бензолом (по 1 мл). Элюат выпаривают в токе нейтрального газа, а сухой остаток растворяют в абсолютном спирте и доводят объем до 4,6 мл. Добавляют 0,2 мл α,α'-дипиридила. Колориметрируют при 490 нм через 2,5 мин после добавления $FeCl_3$. Расчет ведут по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору D,L-α-токоферола.

Источники: 74, 75.

Клиническое значение. Богаты токоферолами растительные масла, зародыши пшеницы, ячменя и других злаковых культур. Всасываются токоферолы в тонком кишечнике при наличии в корме жиров. Непосредственное участие в этом процессе принимают желчные кислоты. Основная функция токоферола — регуляция интенсивности свободных радикалов в клетках, ограничение скорости процессов перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в липидах биологических мембран. Благодаря токоферолу обеспечивается стабильность клеточных мембран. Токоферолы защищают витамин А от перекисного окисления, являются синергистами селена — тормозят перекисное окисление липидов. Селен как кофактор глутатионпероксидазы участвует в инактивировании гидропероксидов липидов.

Недостаточность токоферола сопровождается усилением процессов перекисного окисления липидов, атрофией семенников и бесплодием, рассасыванием плода на ранних сроках беременности, мышечной дистрофией, некрозами печени и мозга и т. д.

В норме сыворотка крови здоровых животных содержит 0,6—1,4 мг% (14—34 мкмоль/л) токоферолов. У новорожденных животных их 0,3—0,5 мг% (7—12 мкмоль/л). Причина гиповитаминоза Е — недостаток в кормах токоферолов, плохое их усвоение вследствие заболевания печени, желудка и кишечника. Уровень витамина Е в крови также зависит от степени обеспеченности организма β-липопротеидами, ответственными за транспорт токоферолов в организме.

Определение витамина С в плазме крови. Принцип. Аскорбиновая кислота (витамин С) восстанавливает трехвалентное железо в двухвалентное. Последнее образует с α,α'-дипиридилом комплексное соединение розового цвета.

Реактивы: 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ). 5 г ТХУ растворяют в 95 мл дистиллированной воды;

40%-ный раствор ТХУ. 40 г ТХУ растворяют в 60 мл дистиллированной воды;

3%-ный раствор железа хлорного ($FeCl_3$). 1,5 г $FeCl_3$ растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Хранят не более 3 сут;

1%-ный раствор α,α'-дипиридила. В воде α,α'-дипиридил растворяется плохо, поэтому навеску его необходимо смочить 96%-ным этиловым спиртом. К 0,5 г α,α'-дипиридила приливают 4 мл спирта, а затем в мерной колбе на 50 мл доливают дистиллированной водой до метки;

85%-ная фосфорная кислота (орто);

аскорбиновая кислота.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; центрифуга; центрифужные пробирки; мерные колбы на 50 и 100 мл.

Ход определения. К 2 мл плазмы крови добавляют 0,3 мл охлажденного 40%-ного раствора ТХУ, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин на холоде (в воде со льдом) с целью более полной денатурации белков. Центрифугируют 20 мин при 2000 $мин^{-1}$. К 1 мл надосадочной жидкости прибавляют 0,5 мл бидистиллированной воды, 0,1 мл 85%-ного раствора фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α,α'-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора $FeCl_3$. Содержимое пробирки после добавления каждого реактива тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин для развития окраски. Окраска стабильна в течение 1 сут.

По истечении 30 мин пробы центрифугируют при 2000 $мин^{-1}$ и колориметрируют на ФЭКе при длине волны 525 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 5 мм против контрольной пробы (вместо надосадочной жидкости берут дистиллированную воду, а затем поступают так же, как с опытной пробой).

Расчет содержания витамина С ведут с помощью калибровочного графика. 33,3 г аскорбиновой кислоты растворяют в 100 мл 5%-ного раствора ТХУ. 10 мл этого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки 5%-ный раствор ТХУ. В 6 мерных колб на 100 мл вносят последовательно 4, 6, 8, 10, 20 и 30 мл стандартного раствора и доводят объем до метки дистиллированной водой. По 1,5 мл раствора из каждой колбочки вносят в центрифужные пробирки, прибавляют по 0,1 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто), 0,8 мл 1%-ного раствора α,α'-дипиридила и 0,1 мл 3%-ного раствора $FeCl_3$, перемешивают, ставят на 30 мин для проявления окраски.

Перед колориметрированием пробы центрифугируют 5 мин при 2000 мин$^{-1}$. Полученные результаты изображают графически на миллиметровой бумаге.

Примечания. 1. Стандартные растворы аскорбиновой кислоты нестойки. Их готовят непосредственно перед определением. 2. Содержание витамина С в плазме крови при ее хранении снижается. 3. Определять количество витамина С необходимо в свежей плазме, отделенной от форменных элементов в течение 4 ч после отбора проб крови.

Источники: 44, 60.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Аскорбиновая кислота участвует в различных обменных реакциях: гидроксилирование пролина при синтезе коллагена: превращение 3,4-диоксифенилэтиламина в норадреналин; превращение кортикостероидов и трансферина и т. д. Всасывается она в желудочно-кишечном тракте, главным образом в тонком кишечнике. Уровень аскорбиновой кислоты в сыворотке крови животных колеблется в пределах 0,2—1,5 мг%. В плазме крови он несколько выше, чем в сыворотке. Снижение содержания в сыворотке крови до 0,3—0,4 мг% и ниже сопровождается клиническими симптомами гиповитаминоза.

Определение витамина B_{12} в биологических жидкостях и тканях. Количественное определение витамина B_{12} (кобаламин, цианкобаламин) в настоящее время проводится химическими и микробиологическими методами. Наибольшей точностью и специфичностью обладает микробиологический метод.

П р и н ц и п. Микробиологический метод количественного определения витамина B_{12} с культурой Escherichia coli 113-3 основан на определении интенсивности роста микроорганизмов путем измерения мутности их размножением. По данным интенсивности роста в исследуемом материале строится стандартная кривая, по которой находят искомое количество витамина.

Р е а к т и в ы: 1) культура Escherichia coli 113-3. Ее выращивают на агаровых косяках и хранят в холодильнике. Раз в месяц культуру пересевают на свежую агаровую среду и после пересева выдерживают 24 ч в термостате при 37 °С;

2) агаровая среда. Состав агаровой среды в расчете на 100 мл: а) казеиновый кислотный 10%-ный гидролизат — 6 мл; б) калия фосфат двузамещенный (K_2HPO_4) — 20 мг; в) железа сульфат ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) — 0,5 мг. 100 мг $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ разводят в 100 мл дистиллированной воды, отсюда берут 0,5 мл; г) магния сульфат ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) — 20 мг. Указанные компоненты растворяют последовательно в одной порции воды; д) L-аспарагин — 20 мл (L-аспарагин растворяют отдельно с прибавлением нескольких капель 1 н. раствора HCl при слабом подогревании и затем прибавляют к вышеуказанному раствору. pH раствора доводят 1 н. раствором NaOH до 7,0. Затем добавляют); е) глицерин (10 г глицерина до-

бавляют к 50 мл дистиллированной воды, отсюда берут 1 мл); ж) агар-агар — 1,5 г; з) витамин B_{12} (из ампулы, содержащей 100 мкг/мл, берут 0,1 мл) — 10 мкг; и) вода дистиллированная — 100 мл.

После подогревания на водяной бане до растворения агара вносят витамин B_{12}, смесь тщательно перемешивают, разливают в пробирки по 50 мл и стерилизуют в автоклаве 15 мин при 10^5 Па (1 атм);

3) основная среда. Состав основной среды на 1 л: а) калий фосфорнокислый двузамещенный (K_2HPO_4) — 14 г; б) калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) — 6 г; в) натрий лимоннокислый ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 5H_2O$) — 1 г; г) магний сернокислый ($MgSO_4 \times \times 7H_2O$) — 0,2 г; д) аммоний сернокислый $[(NH_4)_2SO_4]$ — 2 г; е) натрия хлорид (NaCl) — 1,0 г, ж) калия цианид (KCN) — 2 мг; з) вода дистиллированная — до 1 л.

Указанные ингредиенты растворяют последовательно в дистиллированной воде. Калия цианид добавляют в виде раствора, в 1 мл которого содержится 0,1—0,2 мг. Конечный pH среды должен быть в пределах 6,8—7,0. Во избежание потемнения при повторных стерилизациях растворы солей и глюкозы (4 г на 1 л дистиллированной воды) готовят и стерилизуют отдельно кипячением в течение 30 мин. Непосредственно перед опытом оба раствора, т. е. основную массу с калия цианидом и раствор глюкозы, смешивают в соотношении 1:1;

4) агар;

5) ацетатный буфер. Готовят растворением в ацетате натрия тригидрата 13,61 г и 6 г 100%-ной уксусной кислоты в 1 л дистиллированной воды;

6) 1 н. раствор NaOH;

7) 0,2 н. раствор NaOH;

8) 1 н. раствор HCl;

9) 0,2 н. раствор HCl;

10) толуол;

11) витамин B_{12} в ампулах, применяемый для терапевтических целей;

12) дистиллированная вода.

Оборудование: термостат; сушильный шкаф; автоклав; аналитические весы; водяная баня; фарфоровые ступки и пестики; бюретки; мерные колбы на 100, 250 и 1000 мл; мерные цилиндры на 100 мл; воронки; стаканчики на 150—200 мл; пипетки; промывная колба; беззольные фильтры; пробирки 20 × 160 мм; центрифужные пробирки: марлево-ватные пробки; бактериальная петля.

Ход определения. *Обработка содержимого рубца.* Содержимое рубца разводят дистиллированной водой в соотношении 1 : 100. К 1 мл разведения, взятого в пробирку, добавляют 1 мл ацетатного буфера с pH 4,63 и доводят водным раствором калия цианида (концентрация 1,2 мг/л) до объема 20 мл. Пробирку закупо-

ривают пробкой, перемешивают содержимое и помещают на 15 мин в кипящую баню. После остывания содержимое пробирки взбалтывают и фильтруют через сухой беззольный фильтр в сухую стерильную пробирку. Фильтрат должен быть совершенно прозрачным. Его pH при помощи 1 н. раствора NaOH и 0,2 н. раствора HCl доводят до 6,8—7,0. Этот фильтрат в случае необходимости может храниться в холодильнике в закрытой пробирке до 7 дней.

Обработка ткани печени. Ткань печени, замороженную в жидком кислороде или азоте, растирают в фарфоровой ступке. Берут навеску 100 мг и тщательно растирают с 0,5 мл ацетатного буфера и небольшим количеством вышеупомянутого раствора калия цианида, переносят в колбочку и доводят раствором последнего до 50 мл. Затем колбочки закрывают марлево-ватными пробками и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, дают остыть, фильтруют, разводят дистиллированной водой 1 : 10 000 и при помощи 1 н. раствора NaOH или 0,2 н. раствора HCl доводят pH до 6,8—7,0.

Обработка ткани мышц. Ткань мышц, замороженную в жидком кислороде или азоте, растирают в фарфоровой ступке. Берут 200 мг ее и тщательно растирают с 1 мл ацетатного буфера и небольшим количеством раствора калия цианида, переносят в колбочку и доводят этим раствором до 20 мл. Затем колбочку закрывают марлево-ватными пробками и помещают на 15 мин в кипящую водяную баню, дают остыть, фильтруют и при помощи 1 н. раствора NaOH или 0,2 н. раствора HCl доводят pH до 6,8—7,0.

Приготовление стандартного раствора витамина B_{12}. Для получения калибровочной кривой используют водный раствор витамина B_{12}, в 1 мл которого содержится 0,1 мкг витамина. Раствор хранят в холодильнике с притертой пробкой под слоем толуола. В день опыта делают дальнейшее разведение в 2000 раз до содержания 0,00005 мкг витамина B_{12} в 1 мл (50 пкг).

Постановка опыта включает приготовление стандартного ряда исследуемых и контрольных образцов.

Стандартный ряд. По стандартному ряду строится стандартная (калибровочная) кривая. Для стандартного ряда готовят 30 одинаковых пробирок (размером 20 × 160 мм). В каждую пробирку наливают 5 мл основной среды и возрастающее количество раствора витамина B_{12} концентрации 50 пкг/мл, а именно 0, 0,5, 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 мл и дополняют дистиллированной водой до 10 мл. Пробирки с раствором закрывают марлево-ватными пробками и стерилизуют в кипящей водяной бане в течение 30 мин, дают остыть и до посева сохраняют при комнатной температуре.

Исследуемые образцы. Для каждого исследуемого образца берут 6 пробирок (таких же, как для стандартного ряда). Затем в пробирки вносят по 5 мл основной среды и добавляют различные количества исследуемого материала (экстракта) — 0,5; 1,0; 1,5 мл, а на каждую градацию берут две пробирки. Объем раствора во всех про-

бирках доводят дистиллированной водой до 10 мл и стерилизуют, как стандартный ряд.

Контрольные образцы. 2 мл обработанного материала в пробирке смешивают с 2 мл 0,2 н. раствора NaOH и кипятят в водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения доводят pH раствора до 6,8—7,0 при помощи 10—12 капель 0,2 н. раствора HCl или 0,2 н. раствора NaOH и фильтруют через беззольный фильтр с последующим промыванием дистиллированной водой. Фильтрат переливают в пробирку, содержащую 5 мл опытной среды, дополняют дистиллированной водой до 10 мл и стерилизуют, как и опытные образцы. Для каждого исследуемого материала готовят два таких образца.

Посев. В стандартный ряд исследуемые и контрольные образцы вносят по одной капле из одной и той же пипетки бактериальной взвеси, приготовленной следующим образом. Две центрифужные пробирки с 5 мл опытной среды и 5 мл стандартного раствора витамина B_{12} (50 пкг/мл в каждой) стерилизуют в кипящей водяной бане в течение 30 мин и после охлаждения засевают E. coli с твердой агаровой средой. Засеянные пробирки ставят в термостат при 37 °С на 20—24 ч. Затем бактериальную суспензию центрифугируют 15—20 мин при 4000 мин$^{-1}$. Жидкость смывают, осадок промывают, центрифугируя с физиологическим раствором NaCl. Осадок суспендируют в 2 мл физиологического раствора NaCl и полученную взвесь используют для посева. Все пробирки на 20—24 ч помещают в термостат при 37 °С.

Учет интенсивности роста E. coli. По окончании инкубации содержимое каждой пробирки взбалтывают и замеряют мутность на фотоэлектроколориметре (ФЭК-М) при синем светофильтре по шкале, показывающей процент пропускания света. По полученным данным строят калибровочную кривую. При построении стандартной кривой лучше не соединять все полученные точки, а провести плавную кривую между ними. По величине светопропускания трех параллельных пробирок (берут среднее арифметическое) на оси абсцисс находят соответствующее количество витамина в данной пробирке. Для этого откладывают на оси ординат среднее значение мутности для каждой точки стандартного раствора витамина B_{12}, содержащегося в данной пробирке. Затем, учитывая количество обработанного материала, высчитывают концентрацию витамина B_{12} умножением на разведение. Из полученных величин берут среднюю, а из полученной средней вычитают полученную в контрольном опыте.

Точность и воспроизводимость метода при прочих равных условиях в значительной степени зависят от применяемой культуры E. coli, чувствительность которой к витамину B_{12} может значительно меняться в зависимости от условий культивирования — частоты пересева, качества твердой среды, температурного режима и других факторов.

Источники: 38, 56.

К л и н и ч е с к о е з н а ч е н и е. Витамин B_{12} синтезируется микроорганизмами рубца и кишечника. Для синтеза цианкобаламина используют микроэлемент кобальт. В тканях кобаламин образует коферментные формы: метилкобаламин и дезоксиаденозинкобаламин, которые участвуют в реакциях образования метионина, превращения метилмалонил-КоА в сукцинил-КоА, в образовании коферментных форм фолацина, а следовательно, в синтезе ДНК и в пролиферации кроветворных клеток.

Недостаток кобаламина отмечается при дефиците протеина, кобальта, болезнях желудочно-кишечного тракта, сопровождаемых нарушением микробиального синтеза витамина B_{12}. Гиповитаминоз B_{12} характеризуется нормо- или гиперхромной мегалобластической анемией, плохим усвоением белка и как следствие этого исхуданием, снижением в крови, тканях, рубцовом содержимом концентрации кобаламина.

Содержание витамина B_{12} в различных материалах (по данным Львовской государственной академии ветеринарной медицины)

Содержимое рубца жвачных животных	5—12 мкг%
Печень крупного рогатого скота	300—600 мкг/кг
Почки крупного рогатого скота	200—500 мкг/кг
Мышцы крупного рогатого скота	10—18 мкг/кг
Печень свиньи	60—84 мкг/кг
Кровь крупного рогатого скота	10—18 нг%
Кровь свиньи	5—14 нг%

При гиповитаминозе B_{12} кобаламина в крови телят и поросят содержится менее 78 нмоль/л, в печени — менее 0,1 мкг/г; выделение метилмалоновой кислоты с мочой возрастает до 30 мкг/л (В. В. Яшин).

3.3.10. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

В целях оценки обеспеченности организма животных микроэлементами помимо анализа содержания их в кормах нередко прибегают к определению их количества в крови, молоке и других биологических субстратах.

Для определения марганца, цинка, железа и других микроэлементов используют химические, атомно-абсорбционные, полярографические и другие методы.

Определение кобальта в крови по методу С. И. Гусева в модификации А. А. Титовой. П р и н ц и п. Метод основан на получении окрашенного комплекса кобальта с 2-(2-пиридилазо)-5-диэтилметаминофенолом (ПААФ) при pH 5, экстракции его хлороформом и измерении оптической плотности среды.

Для устранения влияния других микроэлементов, реагирующих с ПААФ, их окрашенные комплексы разрушают 5 моль/л раствором серной кислоты.

Реактивы: 20%-ный раствор натрия цитрата (х. ч.);

3 моль/л раствор натрия ацетата трехводного (х. ч.). 408 г соли растворяют в бидистиллированной воде и доводят объем до 1 л;

0,3 моль/л раствор соляной кислоты. В мерную колбу на 1 л вносят 24 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доливают до метки бидистиллированной водой;

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

азотная кислота концентрированная (х. ч.);

5 моль/л раствор серной кислоты. 266,3 мл серной кислоты (плотность 1,84) доводят бидистиллированной водой до 1 л;

хлороформ;

калибровочный раствор кобальта основной. 0,4034 г кобальта хлорида ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$, х. ч.) растворяют в бидистиллированной воде, добавляют 5 мл концентрированной соляной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл калибровочного раствора содержится 100 мкг кобальта;

рабочий калибровочный раствор кобальта. 1 мл основного калибровочного раствора разводят до 100 мл 0,3 моль/л раствором соляной кислоты. В 1 мл раствора содержится 1 мкг кобальта;

20%-ный раствор соляной кислоты. 48,2 мл соляной кислоты (плотность 1,19) доводят до 100 мл бидистиллированной водой.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; фарфоровые тигли или чашки; сушильный шкаф; весы аналитические; электроплитка; муфельная печь; водяная баня; бюретка на 25 мл; пипетки измерительные на 0,2, 1, 5 и 10 мл.

Ход определения. В фарфоровый тигель (или чашку) вносят 20 мл цельной крови, ставят на электроплитку и медленно обугливают. Далее озоляют в муфельной печи в течение 4 ч при температуре 500—550 °С. В теплый тигель приливают 2 мл 50%-ной азотной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, смывая приставшие к ней частицы бидистиллированной водой в тигель. Упаривают досуха на электроплитке или водяной бане, не допуская разбрызгивания содержимого. Тигель ставят в муфельную печь, доводят температуру до 500 °С и выдерживают в течение 1 ч. При наличии частичек угля обработку азотной кислотой повторяют. К золе приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Тигель накрывают часовым стеклом, ставят в водяную баню и кипятят 5 мин. Содержимое тигля фильтруют в мерную колбу на 25 мл. Тигель обмывают несколько раз бидистиллированной водой и объем доводят до метки.

В делительную воронку или пробирку с притертой пробкой на 45—50 мл вносят 10 мл раствора золы, 2,5 мл 20%-ного раствора натрия цитрата, 2,5 мл 3 моль/л раствора натрия ацетата, 1 мл рас-

твора ПААФ. Тщательно перемешивают после прибавления каждого реактива. Через 10 мин приливают 10 мл 5 моль/л раствора серной кислоты, перемешивают, добавляют 5 мл хлороформа из бюретки и встряхивают в течение 1 мин. Дают слоям жидкости хорошо разделиться, и нижний слой сливают в кювету с толщиной слоя в 1 см. При использовании пробирок с притертой пробкой нижний слой отбирают при помощи пипетки с грушей или отсасывают верхний слой при помощи водоструйного насоса. Фотометрируют при длине волны 570 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля.

Содержание кобальта вычисляют по калибровочному графику. В делительные воронки или пробирки с притертыми пробками вносят 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, 1,5 и 2 мл рабочего калибровочного раствора кобальта. Объем доводят до 10 мл 0,3 моль/л соляной кислотой. Далее поступают, как и с образцом. В контроль вместо раствора кобальта вносят 0,3 моль/л раствор соляной кислоты.

По результатам измерений строят калибровочную кривую.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{AV \cdot 100}{BC},$$

где x — количество кобальта, мкг%; A — количество кобальта, найденное по калибровочной кривой, мкг; V — объем раствора золы, мл; B — количество крови, мл; C — количество раствора золы, взятое на анализ, мл; 100 — коэффициент для пересчета в мкг.

Источники: 49, 52.

Клиническое значение. Кобальт — составная часть витамина B_{12}, который непосредственно участвует во многих обменных процессах в организме, в частности, он необходим для нормального кроветворения (активирует синтез протопорфирина), участвует в синтезе метионина, в процессе переноса кислорода. Кобальт необходим для жизнедеятельности микрофлоры рубца. Он активирующе влияет на щелочную фосфатазу костной ткани. Поэтому его недостаток приводит к нарушению гемопоэза, усвоения питательных веществ корма, задержке роста и развития, снижению продуктивности и воспроизводительной функции, появлению гипокобальтоза, остеодистрофии, анемии, стеатозу печени и другим болезням.

Содержание кобальта в крови колеблется от 2,5 до 5,0 мкг% (0,43—0,85 мкмоль/л), в плазме крови 0,5—0,7 мкг% (0,085— 0,12 мкмоль/л), в молоке 1—4 мкг% (0,17—0,68 мкмоль/л). Снижение уровня кобальта в крови отмечают при его недостаточном поступлении с кормом и водой, плохом усвоении вследствие расстройства деятельности желудочно-кишечного тракта. Низкий уровень кобальта наблюдается при гипокобальтозе, гиповитаминозе B_{12}, алиментарной и экзотической остеодистрофиях, уровской болезни.

Определение йода, связанного с белком (СБЙ), в сыворотке крови по Акланду в модификации С. В. Силаевой. Принцип. Йод в присутствии церия арсената образует окрашенное соединение, интенсивность которого измеряют на фотоэлектроколориметре.

Реактивы: 10%-ный раствор цинка сульфата. 10 г вещества растворяют в 90 мл дистиллированной воды;

0,5 моль/л раствор натрия гидроксида. 20 г натрия гидроксида вносят в мерную колбу на 1 л и доливают бидистиллированной водой до метки;

2 моль/л раствор натрия карбоната. 21,2 г натрия карбоната безводного растворяют в мерной колбе на 100 мл и доводят до метки бидистиллированной водой;

2 моль/л раствор соляной кислоты. Фиксанал соляной кислоты разводят бидистиллированной водой в мерной колбе на 500 мл или берут 82 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19) и доводят бидистиллированной водой до 500 мл;

10%-ный раствор серной кислоты. К 94,5 мл дистиллированной воды приливают 5,5 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84);

раствор мышьяковистого ангидрида. 3,8 г мышьяковистого ангидрида растворяют в 50 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и доводят объем до 500 мл 1,75 моль/л раствором серной кислоты. Ядовит. Хранят в темном месте в эксикаторе;

1,75 моль/л раствор серной кислоты. 97,7 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84) доводят до 1 л бидистиллированной водой;

калибровочный раствор йода. *Раствор А* готовят из фиксанала калия йода. В 1 мл 0,1 моль/л раствора калия йода содержится 12,68 мг йода. *Раствор В*: 2 мл раствора А доводят бидистиллированной водой до 1 л. В 1 мл раствора содержится 25,38 мкг йода. *Раствор С*: 0,4 мл раствора В доводят бидистиллированной водой до 500 мл. В 1 мл содержится 0,202 мкг йода. *Раствор D*: 10 мл раствора С доводят бидистиллированной водой до 100 мл. В 1 мл содержится 0,02 мкг йода;

раствор церия сульфата. Берут 39 г аммоний-церий-сульфата и растворяют в 1 л 1,75 моль/л раствора серной кислоты;

1 моль/л раствор натрия гидроксида. 40 г натрия гидроксида в мерной колбе доводят бидистиллированной водой до 1 л.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; кварцевые пробирки центрифужные; ультратермостат или водяная баня, поддерживающая температуру 37 °С; секундомер; муфельная печь.

Ход определения. В кварцевую центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, 7 мл бидистиллированной воды, 1 мл 10%-ного раствора цинка сульфата и 1 мл 0,5 моль/л раствора натрия гидроксида. После внесения каждого реактива тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Через 30 мин центрифугиру-

ют в течение 15 мин при 3000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость осторожно сливают. Осадок трижды промывают 10 мл бидистиллированной воды с последующим центрифугированием и удалением жидкости.

К осадку добавляют 1 мл 2 моль/л раствора натрия карбоната, перемешивают стеклянной палочкой. Осадок высушивают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 10—12 ч, а затем сжигают в муфельной печи при температуре 400—450 °С. Пробирки охлаждают, к золе добавляют 1 мл 2 моль/л раствора соляной кислоты и 5 мл бидистиллированной воды. Перемешивают стеклянной палочкой тщательно в течение 20—30 мин. Центрифугируют в течение 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. В опытную пробирку вносят 3 мл центрифугата, 1 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 3,5 н. (1,75 моль/л) раствора серной кислоты.

В контрольную пробу вносят 3,5 мл бидистиллированной воды, 0,5 мл 2 моль/л раствора соляной кислоты, 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и 1 мл 1,75 моль/л раствора серной кислоты, сливают осторожно, обмывают ею стенки пробирок, перемешивают и ставят в ультратермостат или водяную баню при температуре 37 °С. Вместе с образцами в термостат помещают пробирку с раствором аммоний-церий-сульфата. Через 10 мин в каждую пробирку (не вынимая из термостата) с интервалом в 1 мин (по секундомеру) вносят 0,5 мл раствора аммоний-церий-сульфата и перемешивают. Фотометрируют через 12 мин (точно) на ФЭКе при синем светофильтре или на спектрофотометре при длине волны 434 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля, поочередно вынимая пробирки из термостата с интервалом в 1 мин.

Расчет результатов проводят по калибровочному графику. В 4 пробирки (№ 1, 2, 3, 4) вносят по 0,5 мл 2 моль/л раствора соляной кислоты. В пробирку № 1 добавляют 3,5 мл бидистиллированной воды, № 2 — 2,5 мл бидистиллированной воды и 1 мл калибровочного раствора D (0,02 мкг йода), № 3 — 1,5 мл бидистиллированной воды и 2 мл раствора D (0,04 мкг йода), № 4 — 0,5 мл бидистиллированной воды и 3 мл раствора D (0,06 мкг йода). Во все пробирки добавляют по 0,5 мл раствора мышьяковистого ангидрида и по 1 мл 1,75 моль/л раствора серной кислоты. Затем все операции выполняют так же, как с образцами.

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

Примечания. 1. В комнате, где проводят анализы, не должно быть следов йода. 2. Посуда и пробирки должны быть тщательно вымыты. 3. Все реактивы должны быть химически чистыми. 4. Используют только би-

дистиллированную воду, полученную с помощью стеклянного (на шлифах) перегонного аппарата.

Источник: 52.

Клиническое значение. Тироксин и трийодтиронин образуются в фолликулярных клетках щитовидной железы из аминокислоты тирозина и неорганического йода. Органический йод плазмы крови представлен в основном гормонами щитовидной железы, связанными с глобулинами и частично с альбуминами. Связанный с белком йод плазмы крови (СБЙ) на 90—95 % состоит из тироксина, поэтому его уровень в крови служит критерием для оценки функционального состояния щитовидной железы. Йод необходим для нормальной жизнедеятельности многих микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

У здоровых взрослых животных содержание СБЙ составляет 5—10 мкг% (394—788 нмоль/л), у телят первого дня жизни — 20,3, на третьи сутки — 12,2 мкг%.

При тиреотоксикозе в сыворотке крови содержится СБЙ выше 10 мкг%, при гипотиреозе — менее 3 мкг%. Снижение уровня СБЙ отмечается при кетозе коров, при недостаточном поступлении йода с кормом и водой, энзоотическом зобе (до 3 мкг% и ниже).

Определение марганца в крови перйодатным методом. Принцип. Калия метаперйодат в кислой среде способен окислять марганец (MnO_4). Мешающие вещества (восстановители) удаляются или разрушаются в процессе обработки золы.

Реактивы: 1%-ный раствор калия метаперйодата (KIO_4, х. ч.). 10 г вещества вносят в химический стакан, добавляют 400 мл бидистиллированной воды и 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты (орто, х. ч.). Смесь подогревают до растворения калия метаперйодата, охлаждают, переносят в мерную колбу на 1 л, доводят до метки бидистиллированной водой;

растворитель. В мерную колбу на 1 л вносят 100 мл концентрированной азотной кислоты (х. ч.), 50 мл 1%-ного раствора калия метаперйодата и доводят объем бидистиллированной водой до метки;

калибровочный раствор марганца основной. 0,4388 г перекристаллизованного марганца сульфата (х. ч.) растворяют в 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл содержится 100 мкг марганца;

рабочий калибровочный раствор марганца. 10 мл основного калибровочного раствора доводят до метки в мерной колбе на 100 мл бидистиллированной водой. В 1 мл содержится 10 мкг марганца;

50%-ный раствор азотной кислоты;

10%-ный раствор азотной кислоты;

азотная кислота концентрированная (х. ч.).

Оборудование: тигли фарфоровые; весы аналитические; муфельная печь; электроплитка; фотоэлектроколориметр; пробирки из термостойкого стекла на 35—40 мл; водяная баня.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 10 мл цельной крови и медленно обугливают на электроплитке. Тигель переносят в муфельную печь, доводят температуру до 500—550 °С и озоляют в течение 2 ч. Золу в тигле обрабатывают 2—3 раза 50%-ной азотной кислотой (2—3 мл идет на первую обработку и по 1—2 мл — на последующие). Содержимое тигля выпаривают на электроплитке. Далее обработку повторяют, добавляя 1 мл кислоты. Золу растворяют в 10 мл растворителя при подогревании и помешивании стеклянной палочкой. Фильтруют в пробирку с меткой на 25 мл. Фильтр предварительно увлажняют дистиллированной водой. Тигель ополаскивают 5 мл дистиллированной воды с последующим фильтрованием в эту же пробирку. К фильтрату добавляют 10 мл 1%-ного раствора калия метаперйодата и кипятят на водяной бане в течение 1 ч. Содержимое тигеля охлаждают и доводят объем бидистиллированной водой до 25 мл, перемешивают. Через 1 ч фотометрируют на ФЭКе при зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм против контроля (10 мл растворителя, 5 мл бидистиллированной воды, 10 мл раствора калия метаперйодата; смесь кипятят 1 ч).

Содержание марганца рассчитывают по калибровочной кривой. В пробирки, куда внесено по 10 мл растворителя, добавляют по 0,5, 1, 2, 3, 4 и 5 мл рабочего калибровочного раствора марганца. Объем доводят бидистиллированной водой до 15 мл, прибавляют 10 мл раствора калия метаперйодата. Пробы кипятят в течение 1 ч. Далее поступают так же, как с образцами. Содержание марганца в пробах составляет соответственно 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мкг.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{A \cdot 100}{B},$$

где x — количество марганца в пробах, мкг%; A — количество марганца по калибровочной кривой, мкг; B — количество крови, мл; 100 — коэффициент пересчета в мкг%. Для перевода мкг% в мкмоль/л полученную величину умножают на 0,182.

Источники: 52, 65.

Клиническое значение. Действие марганца в организме разнообразное: является активатором щелочной фосфатазы, аргиназы, пируваткарбоксилазы, оксалацитаткарбоксилазы и многих других ферментов, участвует в окислительно-восстановительных процессах, тканевом дыхании, костеобразовании. При его недостатке отмечаются задержка роста, остеодистрофия, нарушение репродуктивной функции, расстройства нервной системы, у птицы — своеобразное заболевание — пероз (perosis — скользящий сустав).

В цельной крови и сыворотке марганца содержится примерно одинаково: у крупного рогатого скота 15—25 мкг/100 мл, у овец 5—10, у свиней 5—10 мкг/100 мл.

Определение цинка в крови с дитизоном по Н. А. Чеботаревой. Принцип. Цинк с дитизоном образует комплексное соединение, дающее окраску, интенсивность которой зависит от концентрации элемента.

Реактивы: основной раствор дитизона (ч. д. а.). В делительную воронку на 250 мл вносят 0,02 г дитизона и 100 мл четыреххлористого углерода. Энергично встряхивают в течение 15 мин. Приливают 100 мл бидистиллированной воды, в которую предварительно вносят 0,5 мл 25%-ного раствора аммиака, встряхивают 2—3 мин. Удаляют слой четыреххлористого углерода. Промывают оставшийся оранжевый раствор дитизона 10 мл четыреххлористого углерода. Промывку повторяют 2 раза, сливая каждый раз четыреххлористый углерод. В конце этой процедуры прибавляют 2,5 мл разведенной серной кислоты (1:5). Появляются черные хлопья. Перемешивают, добавляют 100 мл четыреххлористого углерода и встряхивают 1 мин. После разделения фаз раствор дитизона в четыреххлористом углероде сливают в чистую делительную воронку, добавляют 50 мл бидистиллированной воды и встряхивают в течение 1 мин для удаления серной кислоты. Промывку водой повторяют еще 2 раза. Раствор дитизона переливают в сухую склянку темного стекла с притертой пробкой. Хранят в холодильнике до 1 мес. Качество реактива проверяют так: в делительную воронку вносят 5 мл раствора дитизона и 25 мл 0,01 н. раствора аммиака (0,7 мл 25%-ного раствора аммиака на 1 л дистиллированной воды), встряхивают 2—3 мин. Органический слой должен быть бесцветным. Если он окрашен в бурый цвет, то раствор дитизона для анализа не пригоден;

рабочий раствор дитизона. Готовят перед анализом. В сухую мерную колбу на 100 мл вносят 6 мл основного раствора дитизона и доводят объем до метки четыреххлористым углеродом. Хорошо перемешивают;

ацетатный буферный раствор, pH 5. 272 г натрия ацетата трехводного (х. ч.) вносят в мерную колбу на 1 л, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, прибавляют 58 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем бидистиллированной водой до метки. В полученный раствор добавляют 25 мл 50%-ного раствора натрия тиосульфата (натрий серноватистокислый пятиводный);

20%-ный раствор соляной кислоты (х. ч.);

0,3 моль/л раствор соляной кислоты;

калибровочный раствор цинка основной. В мерную колбу на 1 л вносят 100 мг металлического цинка, добавляют небольшое количество бидистиллированной воды и 10 мл 20%-ной соляной кислоты. После полного растворения цинка доводят объем бидистиллированной водой до метки. В 1 мл содержится 100 мкг цинка. При отсутствии металлического цинка можно использовать сернокислый цинк (х. ч.). С этой целью 0,4396 г реактива ($ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$)

растворяют в 1 л бидистиллированной воды, предварительно подкисленной 5 мл серной кислоты. 1 мл основного раствора содержит 100 мкг цинка;

рабочий калибровочный раствор цинка. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл основного калибровочного раствора и доводят до метки 0,3 моль/л раствором соляной кислоты. В 1 мл содержится 1 мкг цинка. Готовят в день проведения анализов;

очистка четыреххлористого углерода. К 500 мл реактива добавляют 10 г активированного угля, встряхивают 5 мин и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Очистку повторяют 2—3 раза с новой порцией угля. После этого четыреххлористый углерод перегоняют в стеклянном аппарате на шлифах. Четыреххлористый углерод марки х. ч. и ос. ч. можно использовать без очистки;

50%-ный раствор натрия тиосульфата (х. ч.). 50 г вещества растворяют в 50 мл бидистиллированной воды;

серная кислота (х. ч.), разведенная 1:5;

аммиак водный, 25%-ный раствор;

активированный уголь.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; муфельная печь; электроплитка; перегонный аппарат стеклянный; тигли фарфоровые; делительные воронки на 250 и 500 мл; бюретки на 50 мл.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 5 мл цельной крови (сыворотки, плазмы) и обугливают на электроплитке, постепенно повышая температуру до 200—250 °С. Затем пробы ставят в муфельную печь и сжигают при температуре 500—550 °С в течение 3—4 ч. Если материал полностью не сгорел, в тигель приливают 1—2 мл 50%-ной азотной кислоты, выдерживают на электроплитке, не допуская разбрызгивания раствора золы, и ставят в муфель на 1 ч при температуре 500 °С. При необходимости эту операцию повторяют. Тигель охлаждают. Золу смачивают 5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты и осторожно упаривают на электроплитке досуха, не допуская разбрызгивания массы и прокаливания остатка.

В тигель приливают 2,5 мл 20%-ного раствора соляной кислоты, 5 мл дистиллированной воды и нагревают на плитке до растворения золы. Смесь охлаждают, переносят в пробирки с меткой на 25 мл (желательно с притертой пробкой) или в мерные колбы на 25 мл, смывая остатки из тигеля бидистиллированной водой, доводят объем до метки и перемешивают.

В делительную воронку или пробирку с притертой пробкой на 40—50 мл вносят 5 мл раствора золы, прибавляют 10 мл ацетатного буфера и перемешивают. Приливают из бюретки 10 мл рабочего раствора дитизона, встряхивают делительную воронку в течение 1 мин. После разделения фаз органический слой сливают в кювету с толщиной слоя 1 см и фотометрируют на ФЭКе при длине волны 538 нм (зеленый светофильтр) против контроля. При использовании пробирок верхний водный слой отсасывают при помощи во-

доструйного насоса или шприца или отбирают сразу нижний слой пипеткой с грушей. При хорошем качестве реактивов цвет не должен изменяться в течение суток.

Содержание цинка в образце находят по калибровочной кривой. Для построения ее в делительные воронки или пробирки с притертыми пробками вносят 1, 2, 3, 4 и 5 мл рабочего калибровочного раствора цинка. Объем до 5 мл доводят 0,3 моль/л раствором соляной кислоты. Далее поступают так же, как и с образцами.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{AV \cdot 100}{BC},$$

где x — количество цинка в пробах, мкг%; A — количество цинка по калибровочной кривой, мкг; V — объем раствора золы, мл; B — количество крови, мл; C — количество раствора золы, взятого для анализа, мл; 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Примечание. Антикоагулянт — гепарин. Отделить сыворотку или плазму от эритроцитов не позднее чем через 45 мин. Избегать контакта крови с резиновыми пробками. Цельная кровь хранению не подлежит. Сыворотку или плазму можно хранить при комнатной температуре в течение 1 нед, при 4—8 °С — 2 нед, при −20 °С — до 1 года.

Источники: 52, 73.

Клиническое значение. Влияние цинка на организм проявляется через действие многочисленных ферментов (карбоксипептидазы, карбоангидразы, щелочной фосфатазы, малатдегидрогеназы, аргиназы, уриназы и др.), для которых он является необходимым компонентом или активатором. При недостатке цинка в организме задерживаются рост, развитие, костеобразование, у поросят появляется паракератоз, у самцов снижается спермопродукция. Нормативы цинка в цельной крови, мкг%: крупный рогатый скот 300—500, свиньи — 400—420; в сыворотке крови: крупный рогатый скот 100—150, овцы 100—200, свиньи 100—160.

Содержание цинка чаще определяют в сыворотке крови. Для этого используют химические, полярографические и другие методы. Цинк, марганец, кобальт, железо в кормах и других объектах определяют на атомно-абсорбционном спектрофотометре (С-115 М-1).

Флуориметрический метод определения селена с 2,3-диаминонафталином. Принцип. Определение селена с 2,3-диаминонафталином (2,3-ДАН) основано на способности этого реактива избирательно образовывать комплексное соединение с четырехвалентным селеном, находящимся в форме селенит-иона (SeO_3^{2-}).

Разложение образца проводится смесью азотной и хлорной кислот, перевод шестивалентного селена в четырехвалентный реакционноспособный селенит-ион достигается нагреванием раствора с концентрированной соляной кислотой.

Четырехвалентный селен в форме селенит-иона (SeO_3^{2-}) взаимодействует с 2,3-ДАН с образованием комплексного соединения 4,5-бензопиазоселенола, флуоресцирующего под действием ультрафиолетовых лучей. Соединение экстрагируют из кислых растворов органическими растворителями — циклогексаном, н-гексаном, декалином, толуолом. Максимум светопоглощения 4,5-бензопиазоселенола в циклогексане находится при 378 нм, максимум флуоресценции — при 520 нм. Интенсивность флуоресценции определяют на флуориметре. Чувствительность метода 0,001 мкг/г.

Реактивы: азотная кислота концентрированная (х. ч.);

соляная кислота (х. ч.);

0,1 моль/л раствор соляной кислоты из стандарт-титра;

аммиак, водный раствор 1:10;

хлорная кислота (х. ч.), 57%-ный раствор;

комплексон III (динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, трилот Б), 2%-ный раствор;

аммония персульфат [$(NH_4)_2S_2O_3$, х. ч.];

селен металлический (х. ч.);

н-гексан или циклогексан, перегнанные;

0,1%-ный водный раствор 2,3-диаминонафталина. 0,1 г реактива заливают 100 мл 0,1 моль/л соляной кислоты, перемешивают до растворения навески и очищают экстракцией гексаном. Для этого солянокислый раствор 2,3-ДАН вносят в делительную воронку, добавляют 15 мл гексана и встряхивают 1 мин. После разделения фаз солянокислый раствор 2,3-ДАН переливают в другую делительную воронку, а органическую фазу выбрасывают. Добавляют к раствору 2,3-ДАН еще 10 мл гексана и очистку повторяют. Очищенный солянокислый раствор 2,3-ДАН фильтруют и используют для анализа. Хранят в склянке темного стекла не более 3—4 дней;

калибровочные растворы селена, содержащие 100, 10, 0,1 мкг/мл. *Раствор А.* Навеску массой 0,1 г металлического селена растворяют в 10 мл концентрированной азотной кислоты сначала на холоде при помешивании, затем при нагревании. Раствор упаривают на водяной бане до влажной массы. Полученную селенистую кислоту (H_2SeO_3) растворяют в воде, раствор переносят в мерную колбу на 1 л, прибавляют 10 мл концентрированной соляной кислоты и доводят до метки дистиллированной водой. Раствор А содержит 100 мкг селена в 1 мл.

Более разведенные растворы селена, содержащие 10 мкг в 1 мл (*раствор Б*) и 0,1 мкг селена в 1 мл (*раствор В*) готовят последовательным разбавлением водой раствора А. Калибровочный раствор В готовят перед использованием;

набор индикаторной универсальной бумаги;

фильтры бумажные обеззоленные, белая лента.

Оборудование: флуориметр ЭФ-3МА с ртутнокварцевой лампой, набором кювет и светофильтров; электроплитка мощностью

800 Вт с несколькими степенями накаливания; водяная баня; делительные воронки на 100 и 250 мл; стаканы термостойкие на 50 и 100 мл.

Ход определения. Для анализа берут 1 г почвы, 50—500 мг кормов, 1 г волос, 1 мл цельной крови, 10 мл молока. Измельченный образец (почва, корма, волосы) или необходимый объем крови (молока) помещают в стаканчик на 50 или 100 мл, добавляют 5 мл концентрированной HNO_3 и 0,1 г аммония персульфата. Стакан закрывают часовым стеклом и осторожно нагревают на электроплитке. После упаривания воды и частичного разложения материала добавляют 5 мл концентрированной азотной кислоты, 3 мл концентрированной хлорной кислоты и нагревают до появления белых паров хлорной кислоты. Если раствор при этом остался темным или желтым, продолжают сильное нагревание раствора, добавляя осторожно по каплям в дымящую хлорную кислоту концентрированную азотную кислоту до полного обесцвечивания раствора. После этого стакан снимают с плитки, охлаждают, смывают стенки стакана 2—3 мл воды и снова нагревают стакан на плитке до появления паров хлорной кислоты. Нельзя при этом допускать выпаривания раствора досуха. На дне стакана должен оставаться остаток хлорной кислоты в количестве 0,5 мл.

Чтобы восстановить шестивалентный селен до четырехвалентного, к остатку после разложения добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают раствор 10 мин на кипящей водяной бане. Затем раствор разбавляют водой до 20 мл.

Устанавливают pH 1 по универсальной индикаторной бумаге, вводя соответственно соляную кислоту или аммиак. Добавляют 2 мл 2%-ного раствора комплексона III, 2 мл раствора 2,3-ДАН и нагревают 5 мин на водяной бане. После охлаждения в течение 10—20 мин раствор переносят в делительную воронку, добавляют 10 мл перегнанного н-гексана и экстрагируют 1 мин. После разделения фаз нижний слой (водный) отбрасывают, а экстракт сливают в пробирку и используют для флуориметрического определения селена. После окончания экстрагирования серии образцов измеряют флуоресценцию органических растворов на флуориметре ЭФ-3МА со светофильтрами ФК-1 (первичный) и $В_2$-2 (вторичный). Количество селена в пробе, выраженное в мкг, определяют по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика из стандартных растворов Б и В готовят разведения с содержанием 0,01, 0,02, 0,05, 0,1 и 0,2 мкг/мл селена. Затем в стаканчики на 50 мл вносят по 1 мл раствора селена, доводят объем до 20 мл 0,1 моль/л раствором соляной кислоты, устанавливают pH 1 и далее ведут анализ, как описано выше.

В каждой серии готовят холостую пробу, учитывают ее значение при расчете содержания селена.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{C}{P},$$

где x — количество селена в образце, мкг/г (мкг/мл); C — содержание селена в образце, мкг; P — масса навески, г (мл).

Содержание селена в процентах вычисляют путем умножения найденного количества селена в мкг/г на 0,0001. Например, в образце содержание селена составило 0,25 мкг/г, это соответствует $0{,}25 \cdot 0{,}0001 = 0{,}000025$ % или $2{,}5 \cdot 10^{-3}$ %.

Источники: 14, 54.

Клиническое значение. Селен участвует во многих окислительно-восстановительных процессах, обладает антиоксидантным действием в составе активного центра глутатионпероксидазы. Этот фермент разрушает токсические пероксиды в тканях, благодаря чему предотвращается жировая дистрофия печени, беломышечная болезнь и др. Данных о нормативах содержания селена в почве, кормах, крови, молоке и других биологических материалах с учетом зональных особенностей недостаточно. Содержание его в кормах колеблется, по данным различных авторов, от 0,01 до 20 мг на 1 кг сухого вещества корма, в цельной крови — от 5 до 18 мкг%, в сыворотке (плазме) — 0,036—0,068 мкг%, в печени — 0,3—1,2 ч/млн, в волосах — 0,5—0,7 ч/млн.

Считают, что при содержании в кормах селена менее 0,01 мг/кг развивается беломышечная болезнь, возникает дистрофия печени, задержание последа, снижается продуктивность, замедляется рост и развитие. О недостатке в организме селена свидетельствуют низкие показатели этого элемента в крови, молоке, волосах, печени и мышцах.

Определение железа в сыворотке крови по цветной реакции с сульфонированным β-фенантролином. Принцип. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой, которая при прогревании разрушает также комплекс железа с трансферином. Для установления оптимальной величины pH, равной 4,8—5,0, добавляют аммония ацетат, а для восстановления всего железа — гидрозин. Двухвалентное железо образует окрашенный комплекс с β-фенантролином, который переведен в сульфатированную форму добавлением хлорсульфоновой кислоты.

Реактивы: 20 %-ная трихлоруксусная кислота;

аммония ацетат. 70 г аммония ацетата (CH_3COONH_4) растворяют в воде, объем доводят до 100 мл. Препарат гигроскопичен;

гидрозина сульфат, насыщенный раствор. 2,5 г препарата заливают 100 мл воды;

раствор сульфонированного β-фенантролина. В пробирке к 100 мг β-фенантролина (4,7-дифинил-1,10-фенантролина) приливают 0,5 мл хлорсульфоновой кислоты, нагревают на кипящей водяной бане 30 с, охлаждают и медленно приливают 10 мл воды.

После этого снова нагревают на водяной бане 5 мин и разбавляют 100 мл воды. Добавляют 5 моль/л NaOH, устанавливают pH 4 и доводят объем водой до 200 мл;

калибровочный раствор железа, содержащий 30 мкмоль/л. Сначала готовят раствор соли Мора [железоаммонийные квасцы, аммоний-железа сульфат — $FeSO_4 \cdot (NH_4)SO_4 \cdot 6H_2O$], содержащий 3 ммоль/л: растворяют 1,178 г в 5 мл 0,3 моль/л HCl и доводят объем до 1 л водой, содержащей в 1 л 1 мл концентрированной серной кислоты. Этот раствор разводят подкисленной водой в 100 раз; получается раствор, содержащий 30 мкмоль/л, или 1,67 мкг/мл железа.

Ход определения. К 2 мл сыворотки крови (без следов гемолиза) прибавляют 2,5 мл воды, 1,5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают и ставят на 15 мин в водяную баню температурой 90—95 °С. Затем центрифугируют 20 мин при 2000—3000 $мин^{-1}$ и отбирают 4 мл прозрачного слоя, к которому приливают 0,35 мл 70%-ного раствора аммония ацетата и 0,3 мл раствора сульфата гидрозина. Смесь фотометрируют при длине волны 535 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см, затем прибавляют 0,4 мл раствора сульфонированного β-фенантролина, оставляют на 1 ч и снова фотометрируют при той же длине волны. Обе фотометрии выполняют против холостой пробы, для которой вместо исследуемой сыворотки берут 2 мл воды. Калибровку проводят так же, как и основной опыт, но вместо сыворотки берут 2 мл калибровочного раствора.

Расчет сывороточного железа ведут по формуле

$$x = \frac{E_{оп1} - E_{оп2}}{E_{к1} - E_{к2}} \cdot 30,$$

где x — количество сывороточного железа, мкмоль/л; $E_{оп1}$ и $E_{оп2}$ — отсчеты опытной пробы до и после прибавления раствора сульфонированного β-фенантролина; $E_{к1}$, $E_{к2}$ — соответственно результаты калибровочной пробы; 30 — содержание железа в калибровочном растворе, мкмоль/л.

Примечания. 1. Время между взятием крови и получением сыворотки не должно превышать 2 ч. При комнатной температуре при хранении в закрытой пробирке железо в сыворотке стабильно 7 дней, при 4—8 °С — 3 нед, при −20 °С — около 1 года. 2. Лабораторную посуду рекомендуется промывать 1%-ным раствором ЭДТА с последующим отмыванием бидистиллированной водой. 3. Если после удаления белков не удается набрать точно 4 мл надосадочной жидкости, можно взять меньшее ее количество и сделать поправку при расчете или же взять точно такое же количество калибровочного раствора.

Источник: 43.

Определение железа в сыворотке крови можно проводить с использованием набора реактивов фирмы «Ла-Хема» (Чехия).

Клиническое значение. Так как подавляющая часть железа находится внутри эритроцитов и входит в состав гемоглобина, определение его в цельной крови не имеет практического значения. Представление о его количестве можно сделать по определению гемоглобина. Большее клиническое значение имеет определение железа в плазме (сыворотке) крови, где содержание его в несколько раз ниже, чем в цельной крови.

Состояние обмена железа объективно характеризует количество депонированного сывороточного железа, т. е. трансферрина, ферритина и гемосидерина, так как это основной резерв, который используется организмом в случае необходимости.

Трансферрин — растворимый в воде железопротеин, гликопротеин с содержанием около 0,13 % железа. Он служит физиологическим переносчиком железа в организме.

Ферритин — железосодержащий белок (металлопротеин) с содержанием железа около 20 %. Он сосредоточен главным образом в селезенке, печени, костном мозге, выполняет роль депо железа в организме.

Гемосидерин — водонерастворимый железосодержащий белковый комплекс, в состав которого входят нуклеопротеиды и углеводы. Содержится главным образом в ретикулоэндотелиоцитах печени и селезенки.

Определение сывороточного железа проводят для выявления железодефицитного состояния. Унифицированным методом определения сывороточного железа является β-фенантролиновый.

Содержание железа в сыворотке крови животных составляет 110—200 мкг/100 мл. Снижение уровня железа в сыворотке крови свидетельствует о развитии железодефицитной анемии, которая часто отмечается у поросят, телят, щенков, ягнят, жеребят, а также у животных других возрастных групп. Причинами ее могут быть недостаточное, скудное, несбалансированное кормление животных; нарушение всасывания железа из пищеварительного тракта при заболевании желудка и кишечника; хронические рецидивирующие кровопотери из желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь); усиленное потребление железа при беременности; замедление мобилизации и нарушение транспорта железа из депо; гипосидеринемия при избыточном накоплении железа в клетках РЭС; потеря трансферина при нефротическом синдроме и др.

Определение меди и железа в крови по Сенделу в модификации С. Г. Кузнецова. Принцип. Медь с дифинилкарбазоном, а железо с *о*-фенантролином при определенном pH образуют соединения, придающие растворам определенную окраску, степень которой измеряется на ФЭКе.

Реактивы: 0,5 моль/л раствор хлористоводородной кислоты; 2 моль/л раствор хлористоводородной кислоты;

10%-ный раствор аммиака;

0,1%-ный водный раствор *п*-нитрофенола ($NO_2C_6H_4OH$);

1%-ный раствор аскорбиновой кислоты;

1%-ный раствор солянокислого *о*-фенантролина. Два последних раствора хранят в холодильнике в темных склянках;

0,1%-ный раствор фенолфталеина;

0,1 моль/л ацетатный буфер, pH 4. В мерной колбе на 1 л растворяют 13,608 г натрия ацетата ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$, х. ч.), приливают 25 мл ледяной уксусной кислоты (х. ч.) и доводят объем дистиллированной водой до метки. Далее буфер фильтруют и определяют pH. Хранят при температуре 4 °С;

0,01%-ный раствор дифинилкарбазона в бензоле. 10 мг реактива переносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют 40—50 мл бензола (х. ч.) и нагревают в стакане с горячей водой до растворения реактива. Колбу охлаждают и доводят объем бензолом до метки. Раствор хранят в темной склянке 2 нед;

основной калибровочный раствор железа (100 мкг/мл). 0,8634 г железоаммонийных квасцов [$(NH_4Fe(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, х. ч.] растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисленной 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочие растворы, содержащие от 1 до 5 мкг железа в 1 мл. Пробы должны содержать от 0,5 до 20 мкг железа;

основной калибровочный раствор меди (100 мкг/мл). 0,3928 г свежеперекристаллизованной меди сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) растворяют в 1 л бидистиллированной воды, подкисляют 5 мл концентрированной серной кислоты. Для построения калибровочной кривой готовят рабочий раствор, содержащий 2 мкг меди в 1 мл (2 мл основного раствора в 100 мл). Берут 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 мл рабочего раствора, доводят объем до 5 мл дистиллированной водой, добавляют по 0,5 мл 0,5 моль/л хлористоводородной кислоты, 1 каплю фенолфталеина и далее поступают по ходу определения меди. Пробы содержат 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 2,0 или 3,0 мкг меди соответственно. При необходимости следует приготовить серию рабочих растворов, содержащих от 0,5 до 5 мкг меди.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; тигли фарфоровые; муфельная печь; электроплитка; пробирки с притертыми пробками.

Ход определения. В фарфоровый тигель вносят 2 мл крови для определения меди или 2 мл сыворотки для определения железа, сжигают в муфельной печи при температуре 550—600 °С в течение 5—7 ч. Если озоления полностью не произошло, то тигель охлаждают, добавляют 1 мл 50%-ного раствора азотной кислоты, осторожно выпаривают на электроплитке и снова помещают в муфельную печь на 1—2 ч. В тигель приливают 5—6 мл 2 моль/л раствора хлористоводородной кислоты, доводят до кипения, а затем переносят в пробирку с меткой на 10 мл. Тигель споласкивают бидистиллированной водой, сливают содержимое в пробирку и доводят объем до метки.

Определение меди. 5 мл раствора золы вносят в пробирку с притертой пробкой, прибавляют 1 каплю 0,1%-ного раствора фенолфталеина, добавляют по каплям 10%-ный раствор аммиака до появления светло-розовой окраски. В случае перетитрования вносят по каплям 2 моль/л раствор соляной кислоты до получения нужной окраски. Для точного установления pH прибавляют 1 мл ацетатного буфера. Розовая окраска исчезает. Затем в пробирку вносят 5 мл (из бюретки на 50 мл) 0,01 %-ного раствора дифинилкарбазона и встряхивают в течение 1 мин. После расслоения верхний слой приобретает красную окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству меди в пробе.

Оптическую плотность верхнего слоя измеряют на ФЭКе при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

Определение железа. 2,5 мл раствора золы вносят в пробирку с меткой на 5 мл, добавляют 1 каплю 0,1%-ного раствора *п*-нитрофенола и нейтрализуют 10%-ным раствором аммиака до появления желтой окраски. Добавляют по каплям 0,5 н. раствор хлористоводородной кислоты до исчезновения окраски. Затем вносят 1 каплю 1%-ного раствора аскорбиновой кислоты, перемешивают и через 10 мин добавляют 5 капель 1%-ного раствора солянокислого *о*-фенантролина. Доводят объем бидистиллированной водой до метки, перемешивают. Измеряют на ФЭКе при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Окраска устойчива в течение суток.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{AV \cdot 100}{C},$$

где x — количество меди (или железа), мкг%; A — количество меди (или железа) по калибровочной кривой, мкг; V — объем раствора золы, мл (для меди 10 мл, для железа 5 мл); C — количество раствора, взятого на анализ, мл; 100 — коэффициент для пересчета в мкг%.

Источники: 42, 52.

Клиническое значение. Медь непосредственно участвует в гемопоэзе, катализирует включение железа в структуру гена, способствует созреванию эритроцитов, является остеогенным элементом, входит в состав медьсодержащего белка — церулоплазмина. Она является составной частью цитохромоксидазы, тирозиназы, уразы и многих других ферментов. При недостатке ее развивается анемия, нарушается пигментация и кератинизация шерсти и пера, наступает дистрофия костей и суставов, снижаются продуктивность и репродуктивная функция. Такие явления сопровождаются снижением меди в крови (норму см. в приложениях 4 и 5).

Избыточное поступление меди ведет к накоплению ее в печени и почках, развивается токсикоз. В этих случаях можно обнаружить повышение концентрации меди в крови.

3.3.11. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

В целях диагностики различных заболеваний используют показатели активности десятков ферментов и их изоферментов. В клинической практике часто определяют активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ), аланинаминотрансферазы (АлАТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), щелочной фосфатазы (ЩФ), глутаматдегидрогеназы (ГлДГ), аргиназы, уракиназы, гистидазы, алкогольдегидрогеназы, цитохромоксидазы, амилазы, сорбитолдегидрогеназы и многих других.

Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотке крови динитрофенилгидрозоновым методом (Рейтмана—Френкеля). Принцип. В результате переаминирования, происходящего под действием АсАТ и АлАТ, образуется щавелевоуксусная и пировиноградная кислоты. Щавелевоуксусная кислота способна в процессе ферментативной реакции превращаться в пировиноградную кислоту. При добавлении 2,4-динитрофенилгидрозина в щелочной среде образуется окрашенный гидрозон пировиноградной кислоты, интенсивность окраски которого пропорциональна количеству образовавшейся пировиноградной кислоты.

Реактивы: 0,1 моль/л фосфатный буфер, pH 7,4. 14,2 г натрия форфата двузамещенного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) и 13,6 г калия фосфата однозамещенного (KH_2PO_4) доводят каждый в отдельности до 1 л дистиллированной водой. Натрий фосфат двузамещенный, содержащий две молекулы воды, получают путем двухсуточного выветривания на воздухе кристаллической соли (х. ч.), содержащей обычно 12 молекул воды. Соль предварительно растирают в ступке в порошок. Для получения буферного раствора pH 7,4 смешивают 840 мл 0,1 моль/л раствора $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и 160 мл 0,1 моль/л раствора KH_2PO_4. Величину pH буфера доводят под контролем pH-метра. Полученный раствор с индикатором бромтимоловым синим должен давать голубую окраску. К приготовленному раствору в качестве консерванта можно добавить 5—10 мл хлороформа;

0,04%-ный раствор бромтимолового синего. 100 мг индикатора растирают в ступке с 3,2 мл 0,05 моль/л раствором натрия гидроксида. После растворения смывают водой в мерную колбу на 250 мл и доводят объем водой до метки;

субстратный раствор для определения аспартатаминотрансферазы. 29,2 мг α-кетоглютаровой кислоты и 2,66 г DL-аспарагиновой кислоты (или 1,33 г L-аспарагиновой кислоты) отвешивают на аналитических весах и растворяют в 1 моль/л раствора натрия гидроксида, который следует прибавлять осторожно, небольшими порциями до полного растворения составных частей и до получения pH 7,4. Раствор приливают количественно в мерную колбу на 100 мл, ополаскивая 0,1 моль/л фосфатным буфером, pH 7,4. Доливают буфер в колбу до метки, тщательно перемешивают, прибавляют 1 каплю хлороформа и сохраняют в холодиль-

ние в замороженном виде. Перед употреблением раствор полностью оттаивают;

субстратный раствор для определения аланинаминотрансферазы. 29,2 мг α-кетоглютаминовой кислоты и 1,78 г DL-аланина (или 0,89 г L-аланина) отвешивают на аналитических весах. Дальнейшая работа, как и с предыдущим реактивом;

раствор 2,4-динитрофенилгидрозина. 19,8 мг реактива растирают в небольшом количестве 1 моль/л раствора соляной кислоты при нагревании на водяной бане. После того как раствор остынет, доводят объем соляной кислотой до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла в холодильнике. Годен в течение 1 года;

0,4 моль/л раствор натрия гидроксида, свободный от карбонатов. Бутыли с реактивом и дистиллированной водой закрывают пробками с поглотительными трубками, наполненными натронной известью или бария гидроксидом;

калибровочный раствор натрия пирувата ($CH_3COCOONa$). 11 мг кристаллического натрия пирувата (белого цвета) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки водой. 1 мл раствора содержит 110 мкг натрия пирувата, что соответствует 88 мкг пировиноградной кислоты.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; весы аналитические; термостат.

Ход определения АсАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АсАТ, нагревают при температуре 37 °С в течение 5 мин, добавляют 0,1 мл сыворотки и инкубируют при 37 °С 60 мин. Затем добавляют 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидрозинового раствора и выдерживают в течение 20 мин при комнатной температуре. Добавляют 5 мл 0,4 моль/л натрия гидроксида, тщательно перемешивают и оставляют для развития окраски на 10 мин при комнатной температуре. Измеряют на ФЭКе при 500—560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят, как опыт, но сыворотку добавляют после инкубации.

Ход определения АлАТ. В пробирку вносят 0,5 мл субстратного раствора для определения АлАТ и нагревают при температуре 37 °С в течение 5 мин. Затем вносят 0,1 мл сыворотки и ставят в термостат при 37 °С на 30 мин. Дальнейший ход анализа осуществляют так же, как и при определении АсАТ.

Расчет активности ферментов в сыворотке крови проводят по калибровочному графику.

Из калибровочного раствора готовят ряд разведений, как указано в таблице 32.

Калибровочные пробы ставят так же, как опытные, но вместо сыворотки добавляют разведенные калибровочные растворы. Из-

32. Разведения для построения калибровочного графика

№ пробирки	Калибровочный раствор натрия пирувата, мл	Дистиллированная вода, мл	Пировиноградная кислота		Активность ферментов АлАТ, АсАТ, нмоль/с · л
			мкг	мкмоль	
1	0,05	0,55	4,4	0,05	278
2	0,10	0,50	8,8	0,10	556
3	0,15	0,45	13,2	0,15	834
4	0,20	0,40	17,6	0,20	1112
5	0,25	0,35	22,0	0,25	1390

меряют против холостой пробы, в которую вместо калибровочного раствора добавляют воду. Калибровочная кривая линейна до величины экстинкции 0,3.

Источник: 43.

Примечание. Метод Райтмана—Френкеля положен в основу заводских наборов реактивов для определения активности АсАТ и АлАТ, выпускаемых ЧНПП «Филист-диагностика» (Украина), фирмой «Ла-Хема» (Чехия) и др. Исследование активности ферментов в сыворотке или плазме должно быть проведено в день взятия крови.

Клиническое значение. Аминотрансферазы переносят аминогруппы от аминокислот к кетокислотам. АсАТ и АлАТ не обладают органной специфичностью, однако определение их активности используют для диагностики болезней печени и сердца.

При гепатитах резко повышается активность АлАТ, поражение миокарда сопровождается преимущественно возрастанием активности АсАТ. Нами (И. П. Кондрахин) отмечено резкое повышение активности АсАТ и АлАТ при травматическом перикардите у коров. У здоровых животных активность АсАТ составляет 0,1—0,55 микромолей пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37 °С, или 28—154 нмоль/с · л. Активность АлАТ в норме составляет 0,1—0,48 микромолей пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37 °С, или 28—134 нмоль/с · л.

При синдроме цитолиза гепатоцитов в несколько раз повышается активность не только АлАТ, но и АсАТ. Активность этих ферментов в сыворотке крови определяют главным образом для диагностики болезней печени и сердца, при которых происходит распад клеток.

Определение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином (метод Севела—Товарека). Принцип. L-лактат под действием фермента сыворотки в присутствии никотинамид-аденин-динуклеотида (НАД) окисляется в пируват, который определяется по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином.

Реактивы: 0,45 моль/л раствор натрия лактата. В мерную колбу на 100 мл вносят 5 мл 80%-ной молочной кислоты (коммерческой), добавляют 2 моль/л раствор натрия гидроксида (ч. д. а., х. ч.) до получения pH 7,5 и доводят объем дистиллированной водой до метки. Хранят в посуде из темного стекла в холодильнике;

0,03 моль/л раствор натрия пирофосфата, pH 8,8. 6,69 г натрия пирофосфата ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$, ч. д. а.) растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, добавляют 1 моль/л раствор соляной кислоты до получения pH 8,8 и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Стабилен 1 мес при хранении в холодильнике;

раствор НАД. Готовят из расчета 3 мг НАД на 1 мл дистиллированной воды. Раствор стабилен 1 мес при хранении в холодильнике;

раствор 2,4-динитрофенилгидрозина. 19,8 мг реактива растворяют в небольшом количестве 1 моль/л соляной кислоты при нагревании в водяной бане. После охлаждения доводят объем 1 моль/л раствором соляной кислоты до 100 мл. На следующий день реактив фильтруют. Раствор хранят в посуде из темного стекла. Стабилен в течение 1 года;

0,4 моль/л раствор натрия гидроксида;

1 моль/л раствор соляной кислоты;

калибровочный раствор пировиноградной кислоты. 11 мг кристаллического натрия пирувата растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки бидистиллированной водой. 1,0 мл раствора содержит 88 мкг пировиноградной кислоты;

рабочий калибровочный раствор готовят разведением основного раствора в 10 раз бидистиллированной водой. 1 мл рабочего раствора содержит 8,8 мкг пировиноградной кислоты.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; термостат; колбы мерные.

Ход определения. 0,1 мл сыворотки, разведенной 1:2, смешивают с 0,3 мл раствора НАД, прогревают 5 мин при 37 °С, добавляют 0,8 мл 0,03 моль/л раствора натрия пирофосфата и 0,2 мл 0,45 моль/л раствора натрия лактата, предварительно прогретых при 37 °С, и инкубируют смесь при 37 °С в течение 15 мин.

Тотчас же после инкубации добавляют 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидрозина, выдерживают 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляют 5 мл 0,4 моль/л раствора натрия гидроксида, перемешивают. Через 10 мин измеряют экстинкцию раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против холостой пробы.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Расчет активности проводят по калибровочному графику. Активность лактатдегидрогеназы выражают в микромолях пировиноградной кислоты, образовавшейся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37 °С, или нмоль/с · л.

Построение калибровочного графика. Из рабочего калибровочного раствора натрия пирувата готовят ряд разведений, как указано в таблице 33.

33. Разведения натрия пирувата для построения калибровочного графика

№ пробирки	Рабочий калибровочный раствор натрия пирувата, мл	0,03 моль/л раствор пирофосфата, мл	Бидистиллированная вода, мл	Содержание пировиноградной кислоты в калибровочной пробе		Активность ЛДГ, нмоль/с · л
				мкг	мкмоль	
1	0,1	0,8	0,5	0,88	0,01	334
2	0,2	0,8	0,4	1,76	0,02	668
3	0,4	0,8	0,2	3,52	0,04	1336
4	0,6	0,8	—	5,28	0,06	2004
5	0,8	0,6	—	7,04	0,08	2672

Затем в пробирки приливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидрозина. Далее калибровочные пробы обрабатывают и измеряют, как опытные. Холостую пробу ставят так же, как калибровочную, но вместо калибровочного раствора добавляют дистиллированную воду. Пересчет активности ЛДГ на микромоли пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37 °С проводят по формуле

$$x = C \cdot 30 \cdot 4/88,$$

где x — активность ЛДГ, нмоль/с · л; C — микрограммы пировиноградной кислоты в калибровочной пробе; 30 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки; 4 — коэффициент пересчета на 1 ч инкубации; 88 — масса 1 мкмоля пировиноградной кислоты, мкг.

Прямолинейная зависимость между концентрацией пировиноградной кислоты и оптической плотности сохраняется от 0 до 10 ммоль ч/мл. Линейная зависимость между концентрацией натрия пирувата и оптической плотностью сохраняется от 0 до 3000 нмоль/с · л.

Примечания. 1. Сыворотка крови должна быть свободной от гемолиза. 2. Для исследования рекомендуется использовать свежую сыворотку. 3. В качестве антикоагулянта не следует использовать соли щавелевой кислоты, так как они ингибируют фермент. 4. В сыворотке активность ЛДГ на 40 % выше, чем в плазме. 5. Сыворотку хранят при комнатной температуре не более 7 дней в закрытых пробирках.

Хранение сыворотки при температуре от +4 до −20 °С делает ее непригодной для анализа.

Разделение изоферментов ЛДГ проводят электрофоретическим методом на пленках из ацетата целлюлозы.

Источник: 29.

Клиническое значение. ЛДГ ускоряет реакцию окисления молочной кислоты в пировиноградную. Нормальная величина ЛДГ от 0,6 до 4,5 микромолей пировиноградной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37 °С, или 160—1200 нмоль/с · л. Повышение активности ЛДГ отмечают при поражении миокарда, печени и почек, причем при болезнях сердца преимущественно повышается активность изоферментов $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$, а при паренхиматозных гепатитах и нефритах — изофермента $ЛДГ_5$. У новорожденных животных активность ЛДГ выше, чем у взрослых.

Незначительное повышение активности ЛДГ отмечают при анемиях, физиологическом напряжении, отравлениях, тиреотоксикозе, злокачественных опухолях. Все заболевания, при которых отмечается некроз тканей, сопровождаются повышением активности ЛДГ. Увеличение активности изофермента $ЛДГ_1$ характерно для поражения сердца. При болезнях печени преимущественно увеличивается активность изоферментов $ЛДГ_5$ и $ЛДГ_4$ и уменьшается активность $ЛДГ_1$ и $ЛДГ_2$.

Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу β-глицерофосфата (метод Бодански). Принцип. Под действием фермента сыворотки крови натрия β-глицерофосфат подвергается гидролизу с освобождением неорганического фосфора. По его количеству определяют активность фермента.

Реактивы: глицерофосфатный субстрат, pH 9,0 ± 0,1. 2,15 г натрия β-глицерофосфата и 2,12 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты натриевой соли (мединал) растворяют в дистиллированной воде и доводят объем в мерной колбе на 500 мл до метки. Определяют pH буферного раствора. Хранят в холодильнике под слоем толуола 7—10 дней;

10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (ТХУ);

серная кислота концентрированная (плотность 1,84);

раствор аммония молибдата (ч. д. а.). 100 г вещества растворяют в 500 мл воды, подогретой до 50 °С. После охлаждения приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, снова охлаждают и переносят в мерную колбу на 1 л, доливают дистиллированной водой до метки;

раствор аммония ванадата (ч. д. а.). 2,5 г вещества растворяют в 500 мл кипящей дистиллированной воды. Кипячение продолжают до тех пор, пока раствор не окрасится в желтый цвет. После охлаждения раствор переносят в мерную колбу на 1 л и доводят объем дистиллированной водой до метки;

реактив на фосфор. Смешивают растворы аммония молибдата и ванадата в равных объемах. Реактив годен 2 мес;

стандартный раствор фосфора основной. 0,439 г калия фосфата однозамещенного (х. ч.), 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. Берут 5 мл основного раствора и доводят объем дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл до метки.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; термостат; эксикатор; электроплитка.

Ход определения. В центрифужные пробирки вносят по 2,5 мл β-глицерофосфатного субстрата и ставят в термостат при 37 °С на 15 мин. На каждую пробу берут 2 пробирки (№ 1 и 2) и на серию исследований 2 пробирки на контроль (№ 3 и 4) и 2 пробирки на субстрат (№ 5 и 6). Через 15 мин в пробирку № 1 добавляют 0,5 мл сыворотки и продолжают нагревать все пробирки в термостате при 37 °С в течение 1 ч (точно). Пробы охлаждают. В пробирку № 2 вносят 0,5 мл сыворотки, в № 3 и 4 — по 0,5 мл дистиллированной воды, в № 5 и 6 — по 0,5 мл рабочего стандартного раствора фосфора.

Во все пробирки вносят по 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и центрифугируют в течение 15 мин при 3000 мин$^{-1}$. Затем берут 2,5 мл надосадочной жидкости, добавляют 2,5 мл реактива на фосфор, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют стоять 2 ч. Центрифугируют 5 мин при 3000 мин$^{-1}$.

Фотометрируют пробы и стандарт при длине волны 436 нм (фиолетовый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля. Контроль ставят так же, как опыт, но вместо центрифугата берут 2,5 мл ТХУ и 2 мл дистиллированной воды.

Расчет ведут по формулам

$$x_1 = A_1/B \cdot 5 \text{ и } x_2 = A_2/B \cdot 5,$$

где x_1 — количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки крови после ее инкубации, мг; x_2 — количество неорганического фосфора, содержащегося в 100 мл сыворотки крови до инкубации, мг; A_1 — оптическая плотность исследуемой пробы после инкубации; A_2 — оптическая плотность испытуемой пробы до инкубации; B — оптическая плотность рабочего стандартного раствора фосфора; 5 — коэффициент (для 5 мг%-ного стандартного раствора фосфора).

Разница в содержании неорганического фосфора до и после инкубации условно обозначается единицами Бодански. По СИ активность фермента выражают в микромолях неорганического фосфора на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации при 37 °С.

$$x = \frac{a \cdot 1000 \cdot 4}{31},$$

где x — активность фермента; a — количество неорганического фосфора, найденное по калибровочному графику, мг; 1000 — пересчет неорганического фосфора в мг; 4 — коэффициент пересчета на 1 мл сыворотки; 31 — масса 1 мкмоля неорганического фосфора, мг.

мкмоль/с.л.

Примечание. Сыворотка не должна быть гемолизированной.

Клиническое значение. Щелочная фосфатаза так же, как и кислая фосфатаза, отщепляет остаток фосфорной кислоты от ее органических эфирных соединений. В сыворотке крови может быть фермент из костной ткани, печени, желчных путей, кишечника и других тканей. В норме активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови равна 1,2—5 ед. Бодански или около 0.4—1.4 мкмоль/мл за 1 ч инкубации при 37 °С, или 110—390 нмоль/с · л.

Щелочная фосфатаза не является строго органоспецифическим ферментом. Значительное повышение ее активности отмечают при холангитах, холецистите, желчекаменной болезни, рахите, остеодистрофии. Несущественные изменения находят при гепатитах, доброкачественных новообразованиях, циррозе печени.

Источники: 29, 39.

Примечания. 1. Есть унифицированный метод определения щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу *п*-нитрофенилфосфата по Бессея—Лоури. Для определения активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по Бадански изготовляются наборы реактивов. 2. В герметически закрытой пробирке сыворотку можно хранить 7 дней при комнатной температуре. 3. Умеренный и сильный гемолиз, липемия, билирубинемия завышают результаты. В плазме активность выше, чем в сыворотке.

Определение активности α-амилазы в сыворотке крови, моче, дуоденальном содержимом амилоклассическим методом со стойким крахмальным субстратом (метод Каравея). Принцип. α-амилаза гидролизует расщепление крахмала с образованием конечных продуктов, не дающих цветной реакции с йодом. Об активности α-амилазы судят по уменьшению интенсивности окраски концентрации крахмала.

Реактивы: бензойная кислота (ч. д. а. или х. ч.);

натрия фосфат двузамещенный безводный ($NaHPO_4$, ч. д. а.);

крахмал растворимый для нефелометрии или крахмал по Lintner. Крахмал по Lintner выпускают зарубежные фирмы специально для использования в качестве субстрата при определении α-амилазы;

154 ммоль/л раствор натрия хлорида;

субстратно-буферный раствор pH 7. 13,3 г безводного двузамещенного натрия фосфата и 2,0 г бензойной кислоты растворяют в 250 мл 154 ммоль/л раствора натрия хлорида и доводят до кипения. Суспендируют 0,2 г растворимого крахмала (крахмал для колориметрии) в небольшом количестве холодной воды и вводят в кипящий буферный раствор. Кипятят 1 мин, охлаждают и доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Стабилен при комнатной

температуре в течение 10—12 дней. Субстратно-буферный раствор должен быть прозрачным;

калия йодид (ч. д. а. или х. ч.);

калия фторид (ч. д. а.);

калий йодноватокислый (ч. д. а., х. ч.);

кислота хлористоводородная (HCl) концентрированная (х. ч.);

0,01 н. раствор йода. 0,036 г калия йодноватокислого и 0,45 г калия йодида растворяют в 40 мл воды и медленно при помешивании добавляют 0,09 мл концентрированной HCl. 5 г калия фторида растворяют в 50 мл воды, фильтруют в мерную колбу, приливают 40 мл раствора йода и доливают водой до 100 мл. Хранят в посуде из темного стекла. Годен в течение 1 мес. Если в рабочий раствор йода не добавляют калия фторид, то его необходимо готовить ежедневно.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; термостат; пробирки, пипетки; мерные колбы; секундомер.

Материал для исследования: светлая сыворотка или плазма крови; моча; дуоденальное содержимое, предварительно разбавленное 154 ммоль/л раствором натрия хлорида.

Ход определения. 5 мл субстратно-буферного раствора вносят в колбу на 50 мл, нагревают 5 мин при 37 °С, добавляют 0,1 мл сыворотки, профильтрованной мочи или дуоденального содержимого (предварительно разведенного 154 ммоль/л раствором натрия хлорида в 100 раз). Инкубируют 7,5 мин при 37 °С. Время инкубации следует строго отсчитывать по секундомеру с момента добавления биологической жидкости в крахмальный субстрат. Тотчас же после инкубации добавляют 5 мл 0,1 н. раствора йода и доводят объем дистиллированной водой до 50 мл. Измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) против воды.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но биологическую жидкость добавляют после инкубации вместе с 0,1 н. раствором йода. Измеряют при тех же условиях, что и опытную пробу, против воды.

Расчет активности α-амилазы выражают в мг или г крахмала, гидролизованного 1 л биологической жидкости за 1 с инкубации при 37 °С.

Расчет ведут по формулам

$$x = \frac{E_1 - E_2}{E_1} CtK \text{ или}$$

$$x = \frac{E_1 - E_2}{E_1} \cdot 160 \cdot K,$$

где x — активность α-амилазы, мг/с · л; E_1 — экстинкция холостой пробы; E_2 — экстинкция опытной пробы; C — количество крахмала, введенного в опытную и холостую пробы (2 мг); t (160) — коэффициент пересчета на 1 с инкубации; K — коэффициент пересчета на 1 л биологической жидкости с учетом разведения.

Источник: 43.

Клиническое значение. Фермент амилаза (диастаза) осуществляет гидролитическое расщепление полисахаридов до декстринов и мальтозы. Богаты амилазой сок поджелудочной железы и слюна. В кровь фермент поступает главным образом из поджелудочной железы, поэтому активность амилазы в крови и моче повышается обычно при заболевании поджелудочной железы. При остром панкреатите она повышается в 10 раз и более. Кроме того, амилазная активность возрастает при перитоните, язвенной болезни свиней, собак и других животных, при заболеваниях почек. Повышение активности амилазы крови, как правило, сопровождается адекватным увеличением ее активности в моче. Однако при нефрозах, гломерулонефритах активность амилазы сыворотки крови увеличена, а в моче снижена.

Снижение активности амилазы в крови и моче наблюдается при гепатитах, дистрофиях печени, сахарном диабете, гипотиреозе, токсической диспепсии.

Нормативы активности α-амилазы в сыворотке крови, моче и других биологических субстратах целесообразно находить на здоровых животных-аналогах.

Примечание: Для получения плазмы крови используют только гепарин. Амилаза стабильна в сыворотке и плазме в течение 1 нед при комнатной температуре или при 2—8 °С, при минус 20 °С — 1 год.

Определение активности сорбитолдегидрогеназы (СДГ) в сыворотке крови по реакции с резорцином (метод Севела—Товарека). Принцип. D-сорбитол под действием фермента сыворотки в присутствии НАД превращается во фруктозу. При реакции фруктозы с резорцином образуется розово-красное окрашивание, интенсивность которого пропорциональна образовавшейся фруктозе.

Реактивы: трис-(оксиметил)-аминометан;

кислота хлористоводородная (HCl) 0,2 моль/л;

0,5 моль/л раствор D-сорбитола в 0,05 моль/л трис-буфере. 0,225 г D-сорбитола растворяют в 2,5 мл 0,05 моль/л раствора трис-буфера. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике;

0,05 моль/л трис-буфер, pH 8,8. 70,5 мг трис-(оксиметил)-аминометана растворяют в 2,5 мл дистиллированной воды, прибавляют 0,4 мл 0,2 моль/л раствора HCl. Доводят pH до 8,8, доливают дистиллированной водой до 10 мл. Раствор стабилен 1 год в случае хранения при комнатной температуре;

0,006 моль/л раствор никотинамидадениннуклеотида (НАД). 25 мг НАД растворяют в 4,5 мл трис-буфера. Раствор стабилен в течение 4 нед при хранении в холодильнике;

100 г/л (10 г/100 мл) раствор трихлоруксусной кислоты;

0,1%-ный раствор резорцина в 96%-ном этиловом спирте;

30%-ный раствор хлористоводородной кислоты (HCl);

0,2 моль/л раствор хлористоводородной кислоты (HCl);

154 ммоль/л раствор натрия хлорида;

калибровочный раствор фруктозы. 27 мг D-фруктозы растворяют в небольшом количестве 154 ммоль/л раствора натрия хлорида, переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки 154 ммоль/л раствором натрия хлорида.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; термостат; колбы мерные; секундомер.

Ход определения. В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл 0,5 моль/л раствора D-сорбитола и 0,3 мл сыворотки, прогревают 5 мин при 37 °С, затем добавляют 0,2 мл 0,006 моль/л раствора НАД, предварительно прогретого при 37 °С и инкубируют 30 мин при 37 °С. Инкубацию прерывают добавлением 0,4 мл 10 г/100 мл раствора трихлоруксусной кислоты. Центрифугируют. В чистую пробирку вносят 0,5 мл надосадочной жидкости, 0,5 мл раствора резорцина, 1,5 мл 30%-ного раствора HCl, перемешивают и помещают в водяную баню при 80 °С точно на 8 мин, охлаждают. Возникающее розово-красное окрашивание измеряют на ФЭКе при длине волны 500—600 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 0,5 см против холостой пробы.

Холостую пробу ставят так же, как опытную, но раствор трихлоруксусной кислоты добавляют до инкубации.

Расчет активности фермента производят по калибровочному графику. Активность СДГ выражают в микромолях фруктозы, образовавшейся при инкубации 1 мл сыворотки в течение 1 ч при 37 °С, или в нмолях фруктозы, образовавшейся при инкубации 1 л сыворотки в течение 1 с при 37 °С. Для перевода мкмолей (ч. мл) в нмоль/с · л найденную величину умножают на коэффициент 16,67.

Для построения калибровочного графика из калибровочного раствора D-фруктозы готовят ряд разведений с добавлением реактивов, как указано в таблице 34.

34. Разведения фруктозы для построения калибровочного графика

№ пробирки	Калибровочный раствор D-фруктозы, мл	0,9%-ный раствор натрия хлорида, мл	Раствор D-сорбитола, мл	Трис-буфер, мл	Раствор ТХУ, мл	Раствор резорцина, мл	30%-ный раствор соляной кислоты, мл	Активность СДГ, нмоль/с · л
1	0,2 калибровочного раствора, разведенного в 10 раз 0,9%-ным раствором NaCl	0,10	0,1	0,2	0,4	0,1	3,0	55,6
2	0,05	0,25	0,1	0,2	0,4	0,1	3,0	139,0
3	0,10	0,20	0,1	0,2	0,4	0,1	3,0	278,0
4	0,20	0,10	0,1	0,2	0,4	0,1	3,0	556,0
5	0,30	—	0,1	0,2	0,4	0,1	3,0	834,0

Далее калибровочные пробы помещают в водяную баню при 80 °С на 8 мин, охлаждают и измеряют при тех же условиях, что и опытные пробы, против холостой пробы. В холостую пробу вместо калибровочного раствора добавляют 154 ммоль/л раствор натрия хлорида.

Пересчет активности сорбитолдегидрогеназы на микромоли фруктозы на 1 л сыворотки за 1 с инкубации при 37 °С производят по формуле

$$x = \frac{C \cdot 1000 \cdot 3300 \cdot 2}{180 \cdot 3600},$$

где x — активность сорбитолдегидрогеназы, нмоль/ с · л; $C \cdot 1000$ — количество D-фруктозы в калибровочной пробе, нм; 3300 — коэффициент пересчета на 1 л сыворотки; 2/3600 — коэффициент пересчета на 1 с инкубации; 180 — масса 1 ммоля D-фруктозы, мкг.

Линейная зависимость сохраняется от 0 до 830 нмоль/с · л.

Примечания. 1. Сыворотка должна быть свежей и свободной от гемолиза. 2. Фермент сыворотки термостабилен. Чтобы избежать потери активности фермента, сыворотку рекомендуется хранить при температуре 2—8 °С.

Источник: 43.

Для определения СДГ в сыворотке крови имеется набор реактивов заводского изготовления, в основу которого положен изложенный выше метод.

Клиническое значение. СДГ содержится главным образом в клетках печени. У здоровых животных ее активность в крови не определяется из-за небольшой чувствительности методов. Повышение активности СДГ в сыворотке крови устанавливают при остром гепатите, токсической гепатодистрофии, при обострении хронического гепатита, синдроме цитолиза гепатоцитов.

Определение активности креатинкиназы (КК) в сыворотке (плазме) крови с использованием креатинфосфата в качестве субстрата. Принцип. Активность фермента пропорциональна количеству креатина, образующегося в результате ферментационной реакции. Креатин определяется по цветной реакции с α-нафтолом.

Реактивы: трис-(оксиметил)-аминометан (трис, х. ч.);

магния сульфат (ч. д. а.);

трис-буфер, 0,1 моль/л, pH 7,4, содержащий 0,015 моль/л Mg^{2+} (в виде $MgSO_4$). 1.2 г триса и 0,180 г $MgSO_4$ помещают в мерную колбу на 100 мл и доливают водой до метки. Раствор стабилен в течение 1 мес при хранении в холодильнике;

0,012 моль/л раствор креатинфосфата динатриевой соли, pH 7,4. Растворяют 0,044 г креатинфосфата в 10 мл воды. Раствор стабилен 1 нед при хранении в холодильнике;

0,004 моль/л раствор аденазин-5-дифосфорной кислоты натриевой соли, pH 7,4. 0,017 г аденозиндифосфата натрия (мол. масса

449) растворяют в 100 мл воды. Раствор стабилен 1 нед при хранении в холодильнике;

50 г/л раствор бария гидроксида восьмиводного (ч. д. а. или х. ч.). 5 г безводного бария гидроксида или 8 г восьмиводного бария гидроксида помещают в мерную колбу на 100 мл и доливают объем до метки водой, не содержащей CO_2;

50 г/л раствор цинка сульфата (ч. д. а., х. ч.). 5 г цинка сульфата помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой, не содержащей CO_2;

α-нафтол (1-нафтол, ч. д. а.);

натрия карбонат (ч. д. а.);

натрия гидроксид (ч. д. а.);

10 г/л раствор α-нафтола. 1 г α-нафтола, 16 г натрия карбоната и 6 г натрия гидроксида помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки водой. Раствор готовят не ранее чем за 2 ч до использования;

основной раствор диацетила в этиловом спирте. 0,2 мл диацетила растворяют в 20 мл этилового спирта;

рабочий 0,5 г/л раствор диацетила. К 1 мл основного раствора приливают 20 мл дистиллированной воды. Реактив хранят в холодильнике;

основной калибровочный раствор креатина. 0,131 г креатина помещают в мерную колбу на 100 мл и доливают водой до метки;

рабочий калибровочный 150 мкмоль/л раствор креатина. 1,5 мл основного раствора креатина помещают в мерную колбу на 100 мл и доводят объем водой до метки. Раствор хранят в холодильнике.

Оборудование: спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; мерные колбы; термостат; секундомер.

Ход определения. 0,3 мл буфера, 0,3 мл раствора креатинфосфата, 0,1 мл сыворотки крови нагревают 5 мин при 37 °С. Добавляют 0,3 мл раствора натрия аденозиндифосфата и инкубируют 30 мин при 37 °С. После инкубации добавляют по 0,5 мл растворов бария гидроксида и цинка сульфата, центрифугируют 15 мин при 3000—4000 мин$^{-1}$. К 1 мл центрифугата добавляют 1 мл воды, 1 мл раствора α-нафтола, 0,5 мл раствора диацетила. Для развития окраски пробу помещают в термостат на 30 мин. Измеряют при 520 нм (зеленый светофильтр).

Холостую пробу ставят так же, как и опытную, но вместо раствора аденозиндифосфата натрия добавляют воду.

Для калибровочной пробы 0,3 мл буфера, 0,3 мл раствора аденозиндифосфата, 0,4 мл рабочего раствора креатина обрабатывают так же, как опытную пробу. Измеряют против холостой пробы. Холостую пробу ставят так же, как опытную, но вместо креатина берут воду.

Расчет производят по формуле

$$x = (E_{оп} - E_{хол})/(E_к - E_{хол}) \cdot 333,$$

где x — активность креатинкиназы, нмоль/с · л; $E_{оп}$ — экстинкция опытной пробы; $E_{хол}$ — экстинкция холостой пробы; $E_к$ — экстинкция калибровочной пробы; 333 — коэффициент пересчета креатинфосфата, преформированного 1 л сыворотки за 1 с на наномоли.

Примечания. 1. Берут свежую свободную от гемолиза кровь или плазму с ЭДТА или гепарином. Образцы крови в лабораторию доставляют как можно скорее. Сыворотку хранят в закрытых пробирках в темноте в течение 2 дней при температуре не выше 20—25 °С. 2. Определение активности креатинкиназы в сыворотке крови можно проводить унифицированным методом с использованием креатина в качестве субстрата.

Источники: 43, 69.

Клиническое значение. КК катализирует обратимую реакцию фосфорилирования креатина. Повышение активности КК отмечается при повреждении сердечной или скелетных мышц. При повреждении сердечной мышцы ее активность у человека повышается в 20—30 раз по сравнению с нормой, при повреждении скелетных — еще больше.

При определении активности КК в сыворотке крови животных следует сравнивать величины у клинически здоровых и больных животных. Резкое повышение КК очевидно при миоглобинурии, травматическом перикардите, хирургических заболеваниях (травмах). У новорожденных активность КК выше, чем у взрослых.

Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови по гидролизу ацетилхолинхлорида. Принцип. Под действием холинэстеразы происходит гидролиз ацетилхолинхлорида с образованием уксусной кислоты и холина. Уксусная кислота сдвигает pH буферного раствора, что устанавливается с помощью индикатора по изменению цвета буферного раствора.

Реактивы: 0,9 моль/л раствор ацетилхолинхлорида. 1,63 г ацетилхолинхлорида растворяют в 10 мл дистиллированной воды. При использовании фармакопейного ампулированного препарата содержимое одной ампулы (0,2 г) растворяют в 1,2 мл воды. Раствор хранят в холодильнике. Годен в течение 6—7 дней (из-за гигроскопичности открытую склянку с ацетилхолинхлоридом хранят в эксикаторе);

вероналовый буфер, pH 8,4. 1,5450 г натриевой соли веронала (мединала) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, добавляют 9 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и 150 мл 0,1 г/л раствора индикатора, измеряют pH. Объем доводят дистиллированной водой до 1 л. Буфер хранят в холодильнике в посуде из темного стекла. Годен в течение 1 мес;

индикатор — фиолетовый синий с переходом окраски от желтой к красной в пределах pH 6,8—8,4. 0,1 г сухого индикатора растирают в ступке с 5,7 мл 0,05 моль/л раствора натрия гидроксида. После растворения объем доводят дистиллированной водой до

25 мл. Из полученного 0,4%-ного раствора перед употреблением готовят 0,01%-ный раствор разведением его дистиллированной водой в 40 раз;

0,7%-ный водный раствор прозерина. 0,7 г прозерина растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в посуде из темного стекла;

0,1 моль/л раствор уксусной кислоты. Готовят из стандарт-титра (фиксанала) или путем доведения дистиллированной водой 5,7 мл ледяной уксусной кислоты (х. ч.) до 1000 мл в мерной колбе на 1 л.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня; ультратермостат; мерные колбы.

Ход определения. В пробирку вносят 5 мл вероналового буфера, 0,2 мл дистиллированной воды и 0,1 мл сыворотки. Смесь прогревают при температуре 37 °С в течение 5 мин. Затем добавляют 0,2 мл раствора ацетилхолинхлорида и инкубируют в течение 30 мин при температуре 37 °С. После инкубации добавляют 0,2 мл раствора прозерина. Экстинкцию измеряют на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 5 мм при длине волны 500—560 нм (зеленый светофильтр) против воды. Окраска устойчива в течение 1 ч.

Контроль ставят так же, как опыт, но раствор прозерина добавляют до инкубации.

Из экстинкции контрольной (холостой) пробы вычитают экстинкцию опытной. Расчет ведут по калибровочному графику. Активность холинэстеразы выражают в микромолях уксусной кислоты на 1 мл сыворотки за 1 ч инкубации или в нмоль/с · л. В этом случае полученную величину умножают на коэффициент 0,280.

Для построения калибровочного графика из 0,1 моль/л раствора уксусной кислоты готовят разведения, как указано в таблице 35.

Из каждого разведенного раствора отбирают по 0,2 мл, добавляют 5 мл вероналового буфера и 0,1 мл сыворотки, прогревают 5 мин при температуре 37 °С, добавляют 0,2 мл раствора прозерина, 0,2 мл ацетилхолинхлорида. Смесь инкубируют 30 мин при температуре 37 °С, быстро охлаждают. Экстинкцию измеряют при тех же условиях, что и в опытных пробах. Холостую пробу ставят

35. Разведения раствора уксусной кислоты для построения калибровочного графика

№ пробирки	0,1 моль/л раствор уксусной кислоты, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание уксусной кислоты в калибровочной пробе, мкмоль	Активность холинэстеразы, мкмоль/с · л
1	2	8	4	22,2
2	4	6	8	44,5
3	6	4	12	66,7
4	8	2	16	89,0
5	9	1	18	100,0

так же, как калибровочную, но вместо стандартных растворов используют дистиллированную воду. Из экстинкции холостой пробы вычитают экстинкцию калибровочной пробы. Полученную величину экстинкции откладывают на оси ординат, количество мкмоль уксусной кислоты — на оси абсцисс. Линейная зависимость калибровочного графика сохраняется в пределах от 0 до 110 мкмоль/с · л.

Примечания. 1. Активность холинэстеразы заметно не изменяется при хранении сыворотки в герметически закрытых пробирках в холодильнике при температуре 2—6 °С в течение 4 дней. 2. Исследование должно проводиться тотчас после доставки образцов крови в лабораторию. 3. Ложноотрицательные результаты вследствие ингибирования активности холинэстеразы дают цитраты (антикоагулянты), оксалаты, фториды. 4. Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови возможно методом с субстратом бутирилтиохолина йодидом.

Источники: 19, 43.

Клиническое значение. Холинэстераза расщепляет ацетилхолин на холин и уксусную кислоту. Фермент синтезируется в печени, поэтому степень активности холинэстеразы во многом зависит от функционального состояния этого органа.

У здоровых животных активность холинэстеразы сыворотки крови ориентировочно составляет 150—300 мкмоль/ч · мл (42—84 нмоль/с · л). Уменьшение активности холинэстеразы отмечается при хроническом гепатите, циррозе печени, отравлениях фосфорорганическими средствами. Активность холинэстеразы низка у новорожденных животных.

Определение активности уреазы в сое. Реактивы: индикатор феноловый красный. В 10 мл этилового спирта растворяют 50 мг индикатора;

калия фосфат двузамещенный (K_2HPO_4) и калия фосфат однозамещенный (KH_2PO_4) (ч. д. а., х. ч.) перекристаллизованные;

0,05 н. раствор K_2HPO_4. 8,7 г вещества растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л;

0,05 н. раствор KH_2PO_4. 6,8 г вещества растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л;

мочевина (карбамид);

эталонные буферные растворы готовят в колбочках с притертыми пробками, как указано в таблице 36.

Оборудование: ступка фарфоровая; сито с отверстиями диаметром 0,25 мм; колбочки с притертыми пробками.

Ход определения. Измельчают соевый шрот или зерно сои, просеивают на сите. В каждую из семи пробирок вносят по 10 мл эталонного буферного раствора с соответствующими pH и по 2 капли раствора индикатора. В две параллельные пробирки

36. Эталонные буферные растворы

№ колбочки	Вносимые компоненты		pH раствора
	раствор № 3, мл	раствор № 4, мл	
1	61,1	38,9	7,00
2	66,6	33,4	7,10
3	72,0	28,0	7,20
4	80,8	19,2	7,40
5	87,0	13,0	7,60
6	91,5	8,5	7,80
7	94,7	5,3	8,00

вносят по 0,2 г измельченного соевого шрота или соевой муки, по 10 мл буферного раствора № 1 (pH 7,00), по 0,3 г мочевины и по 2 капли раствора индикатора. Пробирки со смесью выдерживают в водяной бане при температуре 20—25 °С в течение 30 мин, периодически осторожно встряхивают. Появившуюся в пробирках окраску сравнивают с эталонной в семи буферных растворах, находят pH испытуемой пробы.

Активность уреазы определяют по формуле

$$x = pH_1 - pH_0,$$

где x — активность уреазы, pH; pH_1 — величина pH раствора испытуемого образца; pH_0 — pH исходного буферного раствора (pH 7,00).

В параллельных пробах корма допускаются расхождения pH не более ±0,05.

Клиническое значение. В соевых кормах, не подвергшихся соответствующей термической обработке, имеются ингибиторы трипсина. Поедание таких кормов птицей и свиньями вызывает расстройство пищеварения, диарею и другие нежелательные последствия. Поэтому в таких кормах перед их скармливанием определяют активность уреазы и выражают ее величиной pH. В соевой муке и шроте для птиц pH должен быть не более 0,1.

Определение активности γ-глутамилтранспептидазы (γ-глутамилтрансферазы) в сыворотке крови с помощью набора реактивов. Принцип. γ-Глутамилтранспептидаза (ГГТ) катализирует реакцию переноса L-глутаминового остатка с хромогенного субстрата на глицилглицин. При этом высвобождается *п*-нитроанилин, оптическую плотность которого измеряют фотометрически. Активность фермента определяют по приращению оптической плотности раствора кинетическим методом или методом постоянного времени. Активность фермента наиболее высока в почках, поджелудочной железе, печени и предстательной железе.

Реактивы: субстрат 200 мг L-глутамил-*п*-нитроанилина;

2,47 г буферной смеси (глицилглицин 1,26 г, трис 1,21 г);

3,0 мл стандартного 5 моль/л раствора *п*-нитроанилина;

дополнительный реактив — 10%-ная уксусная кислота.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр, длина волны 400—430 нм.

Приготовление рабочих растворов. 1. Буферный раствор, pH 8,1. 2,47 г буферной смеси растворяют в 70—80 мл дистиллированной воды в мерной колбе на 100 мл и доливают водой до метки. Раствор стабилен при хранении в холодильнике. 2. Субстратно-буферный раствор. Отбирают 40 мг субстрата и растворяют в 18 мл дистиллированной воды, добавляют 17 мл буферного раствора и доводят до температуры 37 °С. Раствор устойчив при 15—25 °С в течение 10 ч.

Ход определения. *Кинетический метод.* В кювету длиной 1 см, термостатированную при 37 °С, помещают 1,2 мл субстратно-буферного раствора, предварительно приведенного к 37 °С. Затем вводят 0,1 мл сыворотки или плазмы крови, перемешивают и начинают отсчет времени. Измеряют оптическую плотность раствора при 400—430 нм (Hg 405 нм) против воды в течение 1—5 мин после старта.

Для калибровочной пробы 0,1 мл стандартного раствора *п*-нитроанилина (содержимое ампулы) доводят дистиллированной водой до 5 мл. Измеряют оптическую плотность раствора в условиях, аналогичных опытной пробе.

Расчет активности γ-глутамилтранспептидазы ведут по формулам

$$x = 21660\frac{\nabla A}{A} \text{ или}$$

$$x = 77{,}98\frac{\nabla A}{A},$$

где x — активность фермента, нмоль/с·л или мкмоль/ч·мл; 21660 — коэффициент для перевода в нмоль/с·л; 77,98 — коэффициент для перевода в мкмоль/ч·л; ∇A — разность экстинкций опытной пробы в пересчете на 1 мин инкубации; A — экстинкция калибровочной пробы.

Метод постоянного времени. В пробирку вносят 1 мл субстратно-буферного раствора, приведенного к температуре 37 °С, и прибавляют 0,1 мл сыворотки или плазмы крови. Содержимое перемешивают и инкубируют точно 15 мин при 37 °С. Затем добавляют 0 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты и перемешивают.

Холостую пробу ставят так же, как и опытную, но сыворотку добавляют после инкубации.

Измеряют экстинкцию опытной пробы против холостой при длине волны 400—430 нм в кювете с толщиной слоя 1 см.

Активность γ-глутамилтранспептидазы определяют по калибровочному графику. Для построения его из стандартного раствора *п*-нитроанилина (содержимое ампулы) готовят разведения в соответствии с таблицей 37.

37. Разведения *п*-нитроанилина для построения калибровочного графика

№ пробирки	Стандартный раствор *п*-нитроанилина, мл	Дистиллированная вода, мл	Активность фермента	
			нмоль/с · л	мкмоль/ч · мл
1	0,1	0,9	550	1,98
2	0,2	0,8	1100	3,96
3	0,4	0,6	2200	7,92
4	0,8	0,2	4400	15,84
5	1,0	—	5500	19,80

В пробирке отмеривают по 0,1 мл полученных растворов, добавляют по 7 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты, перемешивают и фотометрируют против воды в условиях, аналогичных опытной пробе. Строят график зависимости оптической плотности раствора от активности фермента.

Линейность калибровочного графика сохраняется до активности 5000 нмоль/с · л.

Клиническое значение. Активность фермента в сыворотке крови повышается при гепатобилиарных заболеваниях, болезнях поджелудочной железы, диабете. Наиболее высокая активность ГГТ (ГГФ) отмечается при закупорке желчных протоков и других холестических состояниях, а также при вовлечении печени в злокачественный процесс, когда без признаков желтухи активность фермента возрастает в 10—15 раз. При хроническом гепатите активность ГГФ повышается в несколько раз. ГГФ особенно чувствительна к гепатотоксическим воздействиям. Определение активности ГГТ (ГГФ) — наиболее чувствительный скрининговый тест на заболевание печени, который предпочтительнее определения трансамиаз или щелочной фосфатазы.

По данным Н. В. Утеченко (2003), активность ГГТ в сыворотке крови телят при токсической гепатодистрофии составляла 1103,0 (±118,4) — 2393,0 (±417) нкат/л при норме 150,0 (±30,0) нкат/л.

Примечания. 1. Методика утверждена Минздравом Украины. Приказ № 91 от 8.04.1998 г. 2. При активности пробы выше 5000 нмоль/с · л ее разбавляют физиологическим раствором (0,9 % натрия хлорида). Результат умножают на разделение. 3. Активность γ-глутамилтранспептидазы не изменяется в течение 7 дней при хранении сыворотки крови при 4 °С и в течение 3 мес при минус 20 °С. 4. В случае использования кюветы с рабочим объемом более 1 мл количество рабочего раствора необходимо пропорционально увеличить. 5. Из всех антикоагулянтов предпочтение отдается ЭДТА. Калия оксалат с натрия фторидом снижают активность ГГТ. 6. В сыворотке крови активность ГГТ выше, чем в плазме. 7. Билирубинемия, гемоглобин, липемия дают ложнозаниженные результаты.

3.3.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ В КОРМАХ, КРОВИ И ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТАХ

В связи с неравномерным внесением в почву больших доз азотных удобрений возникает возможность накопления в кормах и воде высоких концентраций нитратного и нитритного азота. При поедании таких кормов или использовании воды у животных нарушается обмен веществ, репродуктивная функция и даже возможно отравление.

В системе профилактики нитратного и нитритного токсикоза важное значение имеет систематический контроль за концентрацией нитратов и нитритов в кормах, воде, крови, молоке и других субстратах.

Для определения нитратного и нитритного азота в почве, кормах, воде и биологических субстратах используют фотометрические, ионометрические и другие методы, применяют автоанализаторы проточного типа.

В ветеринарных и зоотехнических лабораториях для определения нитратов и нитритов в кормах, крови и патологическом материале чаще применяют колориметрический метод с использованием реактива Грисса. В последнее время в агрономии, зоотехнике и ветеринарии широко используют ионометрический экспресс-метод определения нитратного азота в почвах, растениях, кормах, природных водах и биологических субстратах.

Определение нитратов в кормах, крови, молоке и патологическом материале с использованием реактива Грисса. Принцип. Метод основан на извлечении нитратов из проб дистиллированной водой, восстановлении их до нитритов металлическим цинком в растворе уксусной кислоты и взаимодействии последних с реактивом Грисса с образованием азосоединения розово-красного цвета. Реакция специфична для нитратов. Чувствительность определения 40 мкг нитрат-ионов в пробе.

Реактивы: сульфаниловая кислота (ч. д. а.);

1-нафтиламин (α-нафтиламин, ч. д. а.);

уксусная кислота концентрированная (х. ч.);

калия нитрат (KNO_3, х. ч.);

цинковая пыль;

марганца сульфат (ч. д. а.);

реактив Грисса: а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) 0,1 г α-нафтиламина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты. Растворы «а» и «б» хранят отдельно в холодильнике в течение 2 мес. Перед употреблением их смешивают 1:1;

калибровочный раствор калия нитрата основной. Растворяют 1,630 г калия нитрата, высушенного до постоянной массы при 105 °С в дистиллированной воде в мерной колбе на 1 л и доводят

объем раствора до метки дистиллированной водой. 1 мл этого раствора содержит 1 мг нитрат-ионов (NO_3^-). Хранят в холодильнике в течение 3 мес;

рабочий калибровочный раствор калия нитрата. В мерную колбу на 100 мл переносят 20 мл калибровочного раствора калия нитрата и доводят объем до метки дистиллированной водой. 1 мл этого раствора содержит 0,2 мг (200 мкг) нитрат-ионов (NO_3^-). Готовят перед анализом.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; химические пробирки; пипетки на 1, 5, 10, 20 мл; мерные колбы на 100 и 1000 мл; конические колбы; химические стаканы; цилиндры на 10, 50 и 100 мл; мешочки или пленка для диализа.

Ход определения. Для исследования берут 10 г измельченного растительного или патологического материала, такое же количество гепаринизированной крови (молока). Извлечение нитратов из проб крови, молока, патологического материала и кормов, дающих при извлечении окрашенные растворы, проводят методом диализа. Для этого измельченные пробы (сухие пробы предварительно смачивают) помещают в мешочки или пленку для диализа и погружают в стаканчики или колбы с 50 мл дистиллированной воды на 2 ч. Затем диализат фильтруют в калиброванный сосуд, а мешочек с пробой еще раз погружают в 20 мл дистиллированной воды на 30 мин в тот же сосуд. Затем мешочки с пробами вынимают, диализат фильтруют и объединяют с первым, доводя его объем до 100 мл. 6 мл диализата отбирают в пробирку для анализа на нитраты. При малом содержании нитратов в пробе диализат концентрируют до небольшого объема, фильтруют его, измеряют объем и берут 6 мл для анализа.

Для извлечения нитратов из проб растительного материала, образующих неокрашенные растворы, измельченные пробы помещают в конические колбы и наливают 50 мл дистиллированной воды. Извлечение проводят 1 ч, часто встряхивая колбы. Затем раствор фильтруют, пробу еще раз смывают 20—30 мл дистиллированной водой и объединяют с первой частью фильтрата, пропуская через тот же фильтр. Далее поступают так же, как описано выше.

В пробирку с 6 мл анализируемого фильтрата приливают 2 мл 10%-ной уксусной кислоты и вносят на кончике скальпеля смесь цинковой пыли с марганца сульфатом (1 г цинковой пыли предварительно тщательно перемешивают со 100 г марганца сульфата). Пробирку встряхивают 30 с. Затем приливают 1 мл реактива Грисса, перемешивают содержимое пробирки и через 10 мин колориметрируют на ФЭКе при длине волны 536 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против дистиллированной воды. Оптическую плотность окрашенного раствора оп-

ределяют только при наличии прозрачного и бесцветного фильтрата.

Расчет ведут по калибровочной кривой. Для составления шкалы стандартов в 8 химических пробирок наливают рабочий раствор в количестве, указанном в таблице 38.

38. Приготовление стандартных растворов

№ пробирки	Калибровочный раствор калия нитрата рабочий, мл	Вода дистиллированная, мл	Содержание NO_3^-, мг	№ пробирки	Калибровочный раствор калия нитрата рабочий, мл	Вода дистиллированная, мл	Содержание NO_3^-, мг
1	0,0	6,0	0,00	5	1,0	5,0	0,2
2	0,2	5,8	0,04	6	1,5	4,5	0,3
3	0,3	5,7	0,06	7	2,0	4,0	0,4
4	0,5	5,5	0,10	8	3,0	2,0	0,6

В каждую из пробирок приливают по 2 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты и вносят на кончике скальпеля (не более 30 мг) цинковую пыль с марганца сульфатом. Далее проводят все операции так же, как описано для опытных проб.

Для построения калибровочной кривой определяют оптическую плотность растворов в 8 пробирках так же, как при определении опытных проб.

Затем на оси абсцисс откладывают количество нитрат-ионов (мг), а на оси ординат — найденные значения оптической плотности растворов.

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{V_1 B \cdot 1000}{V_2 H},$$

где x — содержание нитратов (нитрат-ионов), мг/кг; V_1 — общий объем фильтрата, мл; B — содержание нитрат-ионов, найденное по калибровочной кривой, мг; 1000 — коэффициент для пересчета на 1 кг; V_2 — объем фильтрата, взятый для анализа, мл; H — масса навески анализируемого образца, г.

При необходимости пересчета в калия нитрат (мг/кг) найденное количество нитрат-ионов следует умножить на 1,6.

Для выражения нитратов в мг% (мг/100 мл) пользуются формулой

$$x = \frac{V_1 B \cdot 100}{V_2 H}.$$

Обозначения те же, что указаны в предыдущей формуле; 100 — коэффициент для пересчета в проценты.

Пересчет результата на абсолютно сухое вещество проводят по формуле

$$x_1 = \frac{x \cdot 100}{100 - W},$$

где x_1 — содержание $N—NO_3$, мг/кг сухого вещества; x — содержание $N—NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; 100 — коэффициент для пересчета в проценты; W — влажность материала, %; $100 - W$ — сухое вещество анализируемого материала, %.

Если необходимо рассчитать содержание нитратного азота в процентах на абсолютно сухое вещество корма, пользуются формулой

$$x_1 = \frac{x \cdot 100}{(100 - W) \cdot 10\,000}, \text{ или } \frac{x}{(100 - W) \cdot 100},$$

где x_1 — содержание $N—NO_3$ в сухом веществе, %; x — содержание $N—NO_3$ в анализируемом материале, мг/кг; 100 — коэффициент для пересчета в проценты; W — влажность анализируемого материала, %; $(100 - W)$ — сухое вещество анализируемого материала.

Пример. В 1 кг зеленой массы кукурузы найдено 1000 мг нитратного азота. Влажность зеленой массы 75 %. В этом случае в 1 кг сухого вещества корма содержится

$$\frac{1000 \cdot 100}{100 - 75} = 4000 \text{ мг } N—NO_3$$

или в % на сухое вещество

$$\frac{1000 \cdot 100}{25 \cdot 10\,000} = 0{,}4 \text{ \% } N—NO_3.$$

Эта методика дает возможность одновременно определить в одной и той же пробе как нитраты, так и нитриты.

Подготовка проб для анализа на нитраты и нитриты в обоих случаях аналогична применению водного извлечения или извлечения с помощью диализа. Из одного и того же фильтрата или диализата отбирают соответствующую часть для анализа — на нитриты по 10 мл, а на нитраты по 6 мл.

Определение нитритов в кормах, крови и патологическом материале с использованием реактива Грисса. Принцип. Метод основан на извлечении нитритов из проб дистиллированной водой и взаимодействии их с α-нафтиламином и сульфаниловой кислотой в кислой среде с образованием азосоединения розово-красного цвета.

Реактивы: сульфаниловая кислота (ч. д. а.);

α-нафтиламин (1-нафтиламин, ч. д. а.);

уксусная кислота концентрированная (х. ч.);

натрия нитрат ($NaNO_2$, х. ч.);

реактив Грисса: а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) 0,1 г α-нафтила-

мина растворяют при нагревании в 20 мл дистиллированной воды, фильтруют и смешивают со 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты. Перед употреблением одну часть раствора «а» смешивают с равной по объему частью раствора «б». Растворы «а» и «б» хранят отдельно;

калибровочный раствор натрия нитрита основной. 0,15 г высушенного при температуре 70—80 °С $NaNO_2$ растворяют в 1 л дистиллированной воды. Раствор хранят в холодильнике, он устойчив в течение 1 мес. 1 мл этого раствора содержит 0,1 мг NO_2^-;

рабочий калибровочный раствор натрия нитрита. 25 мл калибровочного раствора натрия нитрита основного переносят в мерную колбу на 500 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. Раствор должен быть свежеприготовленным. 1 мл содержит 0,005 мг NO_2^-. Этот раствор используют для построения калибровочной кривой.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; химические пробирки; пипетки на 1 и 10 мл; мерные колбы на 500 и 1000 мл; конические колбы; химические стаканы; мешочки или пленка для диализа; цилиндры на 10, 50 и 100 мл.

Ход определения. Для исследования берут 10 г измельченного растительного или животного материала, цельной крови (молока). В качестве антикоагулянта крови используют 1%-ный раствор гепарина. Пробы растительного происхождения, образующие при извлечении нитритов неокрашенные растворы, переносят в конические колбы и заливают 50 мл дистиллированной воды. Нитриты извлекают в течение 1 ч, часто встряхивая содержимое колбы. Затем раствор фильтруют, пробу еще раз смывают 30 мл дистиллированной воды, объединяют эту часть раствора с первой, пропуская через тот же фильтр. Доводят объем до 100 мл и берут 10 мл для анализа на нитриты.

Извлечение нитритов из проб крови, молока, патологического материала и кормов растительного происхождения проводят методом диализа. Для этого измельченные пробы кормов, органов и тканей или пробы крови (молока) помещают в мешочки или пленку для диализа и погружают в сосуд с 50 мл дистиллированной воды на 2 ч. Затем диализат фильтруют в калиброванный сосуд, а мешочек с пробой еще раз погружают в 20 мл дистиллированной воды на 30 мин в тот же сосуд. Этот диализат, фильтруя, объединяют с первым, доводя объем фильтрата до 100 мл дистиллированной водой. 10 мл фильтрата отбирают в пробирку для анализа на нитриты.

В пробирку с 10 мл анализируемого фильтрата добавляют 0,5 мл реактива Грисса и через 15 мин определяют оптическую плотность анализируемого раствора на ФЭКе при длине волны 536 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 10 мм против дистиллированной воды.

39. Приготовление стандартных растворов

№ пробирки	Раствор натрия нитрита, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание NO_2^-, мг	№ пробирки	Раствор натрия нитрита, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание NO_2^-, мг
1	0,2	9,8	0,001	6	1,2	8,8	0,006
2	0,4	9,6	0,002	7	1,4	8,6	0,007
3	0,6	9,4	0,003	8	1,6	8,4	0,008
4	0,8	9,2	0,004	9	1,8	8,2	0,009
5	1,0	9,0	0,005	10	2,0	8,0	0,010

Расчет ведут по калибровочной кривой. Для составления шкалы стандартов в 10 пробирок вносят рабочий калибровочный раствор натрия нитрита в количествах, указанных в таблице 39.

В каждую пробирку вносят по 0,5 мл реактива Грисса. Через 15 мин после развития окраски определяют оптическую плотность в первых семи пробирках. На оси абсцисс откладывают количество NO_2^- в мг, а на оси ординат — найденные значения оптической плотности растворов. Оптическую плотность определяют только при наличии прозрачного и бесцветного фильтратов. В противном случае возможно только визуальное определение (сравнение опытной пробирки со стандартной шкалой).

Расчет ведут по формуле

$$x = \frac{V_1 B \cdot 1000}{V_2 H},$$

где x — содержание нитритов (нитрит-ионов), мг/кг; V_1 — общий объем фильтрата, мл; B — содержание нитрит-ионов, найденное по калибровочной кривой, мг; 1000 — коэффициент пересчета на 1 кг; V_2 — объем фильтрата, взятый для анализа, мл; H — масса навески анализируемого образца, г.

При необходимости пересчета в натрия нитрит (мг/кг) найденное количество нитрит-ионов умножают на коэффициент 1,5.

Если необходимо величину выразить в мг%, то в приведенной формуле берут коэффициент не 1000, а 100.

Клиническое значение. При внесении в почву больших доз азотных удобрений (более 200—300 кг действующего вещества на 1 га) или ненормированного количества жидкого навоза соли азотной кислоты — нитраты не используются полностью растениями на синтез аминокислот и растительного белка и накапливаются в них в концентрациях, вредных для животных и человека.

В процессе использования растениями нитратов образуются промежуточные продукты — нитриты и аммиак, которые значительно токсичнее исходного вещества — нитратов. Поступление в кровь нитритов и нитратов ведет к образованию метгемоглобина, кислородному голоданию, нарушению окислительно-восстановительных процессов и обмена веществ. У жвачных животных нитра-

ты в рубце распадаются до нитритов и аммиака с последующим использованием азота этих метаболитов для синтеза аминокислот и бактериального белка. При значительном поступлении с кормом нитратов образовавшиеся из них нитриты и аммиак не успевают использоваться микрофлорой рубца и всасываются в кровь, вызывая нарушение обмена веществ и токсикоз.

Для животных токсичной концентрацией нитратов в кормах считают 0,21—0,52 % сухого вещества корма.

Наибольшая концентрация нитратов бывает в корнеплодах, бахчевых культурах, зеленой массе кукурузы, ржи, пшенице, овсе, травс многолетних культурных пастбищ при внесении под эти культуры больших доз азотных минеральных удобрений или навоза.

Концентрация нитратов и нитритов в растениях снижается, не достигает токсичной при внесении азотных удобрений дробными дозами в 2—3 приема за сезон, а также при организации регулярного полива.

По нашим данным, содержание нитратов и нитритов снижается в процессе провяливания и сушки трав, силосования зеленой массы. В засушливые годы при нерегулярном поливе содержание нитритов и нитратов в растениях повышается. При поступлении в организм животных больших доз нитратов и нитритов помимо резкого повышения содержания метгемоглобина отмечаются падение уровня гемоглобина до 70 г/л и ниже, повышение общего белка сыворотки крови до 89 г/л и более, положительная коллоидно-осадочная проба. У здоровых животных при умеренном поступлении с кормом нитратов в крови и молоке их не обнаруживают или находят в следовых количествах. При развитии токсикоза содержание нитратов в крови повышается и составляет 30—60 мг/л и более, их находят в определенном количестве в молоке. Максимально допустимые уровни нитратов и нитритов в кормах и воде приведены в таблице 40.

Ионометрический метод определения нитратного азота. Принцип. Метод основан на измерении активности нитрат-иона ионоселективным электродом в солевой суспензии 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов при соотношении пробы и раствора алюмокалиевых квасцов 1:2,5 для почв, 1:100 для сухих растений и кормов, 1:4 для сырого растительного материала. Определение нитратного азота в почве возможно также и в фильтратах водной и 0,05%-ной K_2SO_4 вытяжках при соотношении пробы и экстракта 1:2,5.

Реактивы: калия нитрат (х. ч.);

1 %-ный раствор алюмокалиевых квасцов (ч. д. а.). 10 г алюмокалиевых квасцов растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л;

10%-ный раствор алюмокалиевых квасцов (ч. д. а.). 100 г вещества растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л;

40. Максимально допустимые уровни нитратов и нитритов в кормах (мг/кг корма натуральной влажности) и воде (мг/л)

Корм	Нитраты по NO_3^-	Нитриты по NO_2^-	Корм	Нитраты по NO_3^-	Нитриты по NO_2^-
Зеленый	200—500*	10	Комбикорм для свиней и птиц	200	5
Сено, солома	500—1000*	10	Зернофураж	300	10
Силос, сенаж	300—500*	10	Жом сухой	800	10
Свекла кормовая и другие корнеплоды	800—2000*	10	Жмых, шрот	200	10
Картофель	300	10	Травяная резка	800	10
Комбикорм для крупного рогатого скота	500	10	Вода питьевая	50	3

* Для крупного рогатого скота.

приэлектродный раствор (0,1 моль/л KNO_3 + 0,005 моль/л KCl). 10,11 г KNO_3 и 0,37 г KCl растворяют в воде в мерной колбе на 1 л;

0,1 моль/л калибровочный раствор калия нитрата (KNO_3). 10,11 г калия нитрата перекристаллизованного, высушенного при температуре 105 °С до постоянной массы, взвешивают с погрешностью не более 0,01 г, растворяют в 1%-ном растворе алюмокалиевых квасцов в мерной колбе на 1 л и доводят объем этим же раствором до метки;

0,01 моль/л калибровочный раствор KNO_3. В мерную колбу на 1 л помещают 100 мл 0,1 моль/л раствора KNO_3 и доводят объем до метки 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов;

0,001 моль/л калибровочный раствор KNO_3. Готовят десятикратным разведением 0,01 моль/л раствора KNO_3 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов;

0,0001 моль/л калибровочный раствор KNO_3. Готовят десятикратным разведением 0,001 моль/л раствора KNO_3 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов;

насыщенный раствор KCl. В 100 мл дистиллированной воды при температуре 40—45 °С растворяют максимально растворяющуюся массу KCl и охлаждают.

Калибровочные растворы и приэлектродный раствор хранят в холодильнике. Полученные растворы используют для калибровки прибора.

Оборудование: pH-метр (pH-340, pH-74, И-120, И-130 и др.) с погрешностью измерения ±5 мВ (±0,05 pNO_3); ионоселективный измерительный электрод ЭИ-NO_3-01 или аналогичного образца; электрод сравнения — хлорсеребряный насыщенный электрод типа ЭВЛ-1М3; весы аналитические, погрешность взвешивания не более 0,001 г; весы технические квадрантные, погрешность взвешивания не более 0,1 г; дозатор вместимостью 50 мл для добавления алюмокалиевых квасцов, погрешность дозирования не более 1 %; мешалка лабораторная для перемешивания образца с экстрагентом; гомогенизатор или фарфоровая ступка с пестиком и промытый прокаленный песок; мезгообразователь; мясорубка или пластмассовая терка (для измельчения корнеплодов и овощей); встряхиватель или ротатор Р-120, или блок экстрагирования; мельница для размола сухих образцов почв; мельница для размола сухих проб растений.

Ход определения. *Подготовка ионоселективного измерительного электрода ЭИ-NO_3-01.* Внутреннюю полость корпуса 2 раза промывают дистиллированной водой, а затем 2 раза приэлектродным раствором (0,1 моль/л KNO_3 + 0,005 моль/л KCl). После промывки в корпус электрода заливают пипеткой 1,5 мл приэлектродного раствора и ввинчивают хлорсеребряный индикаторный электрод. Новый электрод перед первым измерением выдерживают в 0,1 моль/л растворе KNO_3. В интервалах между исследованиями, если они не превышают 5 сут, измерительный электрод хранят в $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л растворе KNO_3. При длительных перерывах между исследованиями электрод хранят на воздухе (или в 0,001 моль/л растворе KNO_3), а перед началом работы выдерживают в течение 1—2 ч в 0,1 моль/л растворе KNO_3.

Подготовка сравнительного хлорсеребряного электрода типа ЭВЛ-1М3. После распаковки электрод промывают дистиллированной водой, заливают насыщенным раствором KCl температурой 20 °С. Закрывают отверстие для заливки пробкой и выдерживают электрод сначала в кипящей, а затем в воде комнатной температуры по 15 мин в 3 цикла, погружая электрод в воду на 60—70 мм. В интервалах между работой электрод хранят, надевая пластмассовый колпачок, заполненный дистиллированной водой, и закрывая отверстие для заливки раствора KCl пробкой. Во время работы это отверстие должно быть открытым.

Работоспособность ионоселективного электрода зависит от его характеристики: если при измерении стандартных растворов разность показателей между двумя растворами меньше 48—50 мВ, значит, электрод находится в нерабочем состоянии. Электрод имеет линейную функцию в диапазоне 1,0—4,0 pNO_3 с наклоном 54—56 ± 3 мВ на единицу pNO_3.

Подготовка проб растительной продукции к анализу. Экстракцию нитратов из растительного материала выполняют 1%-ным раствором алюмокалиевых квасцов при соотношении массы пробы

к объему экстрагирующего раствора 1:100 для сухих образцов или 1:5 для влажных проб. Сырой травянистый материал измельчают ножницами, перемешивают, отбирают среднюю пробу массой 10 г, помещают в стакан гомогенизатора, приливают 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов и гомогенизируют 1 мин. Плоды, корнеплоды, ягоды перед анализом, если нужно, отмывают от земли, осушают фильтровальной бумагой и измельчают на терке или мясорубке. Полученную массу перемешивают, отбирают для анализа 10 г, заливают 50 мл 1%-ного раствора алюмокалиевых квасцов и взбалтывают 30 мин.

Растительный материал также можно высушить, а затем измельчить на мельнице. Взять 0,5 г муки, поместить в колбу, залить 50 мл 1 %-ного раствора алюмокалиевых квасцов, встряхивать 5—7 с и оставить на сутки для извлечения нитратов.

Подготовка проб воды. К 9 мл анализируемой воды добавляют 1 мл 10%-ного раствора алюмокалиевых квасцов. Объем воды и раствора алюмокалиевых квасцов можно увеличить соответственно в 2—5 раз, не меняя соотношения пробы воды и раствора квасцов (9:1). В полученном растворе измеряют активность иона нитрата.

Подобным образом готовят *образцы крови и молока.* Смесь крови (молока) с раствором алюмокалиевых квасцов взбалтывают в течение 30 мин на встряхивателе или ротаре. В полученной суспензии измеряют активность иона нитрата. Концентрацию нитратов в крови преимущественно проводят с реактивом Грисса.

Активность иона нитрата в пробе можно измерять непосредственно в pNO_3^- или делать замеры в мВ. Концентрацию ионов NO_3^- на иономере измеряют, пользуясь инструкцией, прилагаемой к прибору. Как пример ниже приводится методика измерения концентрации ионов NO_3 на иономере И-120.1.

1. Перед началом исследований подготовленные к работе электроды подключают к задней панели преобразователя. Мембранный (измерительный) электрод подключают к гнезду «Изм.», а хлорсеребряный (вспомогательный) — к гнезду «Всп.».

2. Кнопку под словом «Анионы» и валентностью, равной 1, утапливают.

Преобразователь включают в сеть и прогревают 30 мин. В течение этого времени тщательно промывают электроды, особенно измерительный, снаружи. Для этого погружают измерительную систему (электрод сравнения должен быть ниже измерительного на 3—4 мм) в стаканчик с дистиллированной водой, меняя ее не менее 3 раз.

3. Вынимают электроды из воды, осушают их полоской фильтровальной бумаги и погружают в первый стандартный раствор с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ М KNO_3 ($pNO_3 = 4$). Стандартные растворы должны иметь ту же температуру, что и исследуемые. Для этого стандартные растворы извлекают из холодильника, если они были приготовлены заранее и хранились в нем, не менее чем за 3—4 ч до

начала измерений. Если измерения планируют начать с утра, то растворы вынимают из холодильника в конце предыдущего рабочего дня.

4. После установления показаний нажимают кнопку pX-КООРДИНАТА на лицевой панели и на цифровом табло преобразователя ручкой pX-КООРДИНАТА, размещенной на боковой стенке, устанавливают значение pNO_3 первого раствора, равное 4.

5. Отпускают кнопку pX-КООРДИНАТА и ручкой КАЛИБРОВКА, размещенной на боковой стенке, устанавливают на табло значение pNO_3 этого раствора, равное 4.

6. После промывки и удаления воды погружают электроды во второй раствор с концентрацией $1 \cdot 10^2$ М KNO_3. После установления показаний ручкой ГРАДИЕНТ, %, размещенной на боковой стенке, устанавливают на цифровом табло значение pNO_3 второго раствора, равное 2,05. Если выставить это значение не удается, то дополнительно используют органы ручной температурной компенсации (ручка «ТЕМПЕРАТУРА, °С»), расположенные на боковой стенке (органы дополнительной настройки по крутизне). Это связано с тем, что данная электродная система не имеет определенных координат изопотенциальной точки, поэтому температурная компенсация не производится.

7. Для проверки настройки иономера нужно вернуться к первому контрольному раствору и повторить настройку по пунктам 3—6 до достижения совпадения значений, после этого приступают к определению pNO_3 исследуемых растворов.

Примечание. При настройке иономера по пунктам 3—6 параллельно снимают отсчеты как в единицах pNO_3, так и в мВ, нажимая клавишу «мВ» на лицевой стороне преобразователя. Отсчеты в мВ необходимы для вычисления крутизны электродной характеристики. Она должна составлять 56,5 + 3,0 мВ на одну единицу pNO_3 при 25 °С. Следовательно, изменение pNO_3 с 4,0 до 2,05 (две единицы pNO_3) должны сопровождаться изменением показания прибора на 113 ± 6 мВ. Если тактическая крутизна электродной характеристики окажется ниже, то это свидетельствует о непригодности электрода и необходимости его замены новым.

Расчет содержания нитратов (NO_3) в воздушно-сухих растительных образцах ведут по формуле

$$x = \frac{10^{-pNO_3} \cdot 62 \cdot V \cdot 10^6}{1000 \cdot H},$$

где x — содержание нитратов, мг/кг; 10^{-pNO_3} — концентрация нитратов в исследуемой вытяжке, моль/дм^3; 62 — молярная масса нитрат-иона, г; V — объем экстрагирующего раствора, см^3; 1000 — коэффициент перевода дм^3 в см^3; 10^6 —

коэффициент пересчета результатов анализа в мг/кг; H — масса навески анализируемого материала, г.

Принимая $V = 50$ см^3, $H = 0{,}5$ г и проведя соответствующие вычисления, получим следующую формулу для расчета:

$$x = 10^{-pNO_3} \cdot 6200.$$

Программа для вычисления результатов на микрокалькуляторах, имеющих функцию 10x, имеет вид

$$pNO_3 \boxed{/-/} \boxed{F} \boxed{10} \boxed{x} 6200 \boxed{=} \boxed{\rightarrow}$$

содержание NO_3, мг/кг.

Расчеты по содержанию нитратов в траве, овощах и фруктах с естественной влажностью производят по формуле

$$x = \frac{10^{-pNO_3} \cdot 62 \cdot 10^6 \cdot \left(V + \frac{\omega H}{100}\right)}{1000 \cdot H},$$

где ω — массовая доля воды в анализируемом материале, %.

Принимая $V = 50$ см^3, $H = 10$ г и проведя соответствующие вычисления, получим следующую формулу для расчета:

$$x = 10^{-pNO_3} \cdot 6200 \cdot (50 + \frac{\omega}{10}).$$

Программа для вычисления результатов на микрокалькуляторах, имеющих функцию 10x, имеет вид

$$\omega \boxed{+} 10 \boxed{+} 50 \boxed{=} \boxed{F} \boxed{ЗАП} pNO_3 -$$

$$\boxed{/-/} \boxed{F} \boxed{10^x} \boxed{x} 6200 \boxed{x} \boxed{F} \boxed{ИП} \boxed{=}$$

$$\rightarrow \text{мг/кг}.$$

Несколько менее точные результаты по содержанию нитратов в траве, овощах и фруктах можно получить, пользуясь таблицами для перевода значений pNO_3 в мг NO_3/кг (приложения 11 и 12).

В литературе примерно в равной мере встречаются три способа выражения концентрации нитратов: в расчете на азот ($N—NO_3$), на нитраты (NO_3) и в перерасчете на $NaNO_3$. Для сопоставления таких данных используют следующие коэффициенты:

$N—NO_3$ в пересчете на NO_3 — 4,43;
$N—NO_3$ в пересчете на $NaNO_3$ — 6,07;
NO_3 в пересчете на $N—NO_3$ — 0,225;
NO_3 в пересчете на $NaNO_3$ — 1,37;
$NaNO_3$ в пересчете на $N—NO_3$ — 0,165;
$NaNO_3$ в пересчете на NO_3 — 0,73.

Нитратный азот с помощью ионоселективного электрода можно определять, используя калибровочный график и снимая показания в мВ. В этом случае нитратный электрод подключают к гнезду «Изм», а хлорсеребряный электрод — к гнезду «ВСП», нажимают клавишу «мВ», включают диапазон измерения pH = 1—4 и делают замеры ЭДС (мВ) в калибровочных и исследуемых растворах. По калибровочному раствору находят величину pNO_3.

Источники: 29, 51, 66.

Для определения нитратов экспресс-методом предложены нитратомеры типа «CARDY» производства фирмы «HORJ BA» (Япония), «Нитрат-тест», «Анион-41ОН», Анион-7011 (частное коммерческое предприятие «ССС», г. Одесса), комплект «Микон-2» (ООО «НикоАналитик», г. Москва). В комплект «Микон-2» входит, в частности, микропроцессорный ионометр «Экспорт-001» и ионоселективный электрод ЭЛИТ-02 (нитрат), которые позволяют значительно упростить процесс измерений и свести его к достаточно простым и наглядным процедурам.

Портативные нитратометры позволяют определять количество нитратов в растениях и воде без специальной подготовки проб к анализу. Некоторые из них имеют автономное питание.

ГЛАВА 4

МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

4.1. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОКА (МОЛОЗИВА)

Отбор проб молока (молозива) для анализа. В связи с тем, что кислотность, содержание иммунных глобулинов, белков, витаминов, минеральных и других веществ в молозиве сильно меняется, исследование его проводят по удоям, начиная с первого. Молоко появляется на 7-е сутки после родов. Пробы молозива и молока берут только из здоровых долей вымени, поэтому перед взятием образцов проводят диагностику клинического и субклинического мастита.

Образцы молока берут из утреннего удоя, молозива — из первого, второго, третьего или последующих удоев. Отбирают среднюю пробу нужного объема, вносят в склянку и закрывают пробкой. Пробы в термосе со льдом доставляют в лабораторию, где обрабатывают с учетом характера проводимого анализа.

Метод обезжиривания молозива (молока). Многие биохимические показатели определяют в обезжиренном молозиве или молоке. Молозиво (молоко) центрифугируют при 3000—4000 мин$^{-1}$ в течение 30 мин, после этого пробу ставят в морозильную камеру холодильника на 20—30 мин, затем через тонкую иглу со шприцем, не затрагивая слой жира, набирают нужное количество обезжиренного молозива или молока и проводят соответствующие исследования. Следует иметь в виду, что состав молозива и молока зависит во многом от срока лактации, условий кормления и содержания, состояния вымени. Лактацию с точки зрения изменения состава и свойств молока делят на три периода: молозивный (7 дней после отела коровы); период выделения нормального молока (285—277 дней) и период выделения стародойного молока (7 дней перед запуском коровы). В период сухостоя в вымени содержится секрет, состав и свойства которого иные, чем молозива и молока.

Определение титруемой кислотности молока (молозива) по Тернеру. Реактивы: 0,1 моль/л раствор натрия (калия) гидроксида. 4 г NaOH или 5,6 г KOH растворяют дистиллированной водой в мерной колбе на 100 мл;

1%-ный раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина растворяют в 70 мл 96%-ного этилового спирта и доводят объем водой до 100 мл;

2,5%-ный раствор кобальта сульфата. 2,5 г кобальта сульфата растворяют в 97,5 мл воды.

Оборудование: бюретка; колба или стакан на 100—200 мл; мерные колбы; пипетки на 10 и 25 мл.

Ход определения. Отбирают среднюю пробу молока утренней дойки или молозива 1, 2, 3-го или последующего удоя из здоровых долей вымени. В колбу или стакан на 150—200 мл вносят 10 мл молока (молозива), 20 мл дистиллированной воды и 3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина, перемешивают и титруют из бюретки 0,1 моль/л раствором натрия (калия) гидроксида до появления не исчезающего в течение 30 с розового окрашивания. В качестве эталона окраски можно использовать 2,5%-ный раствор кобальта сульфата. В колбочку вносят 10 мл молока (молозива), 20 мл дистиллированной воды, 1 мл 2,5%-ного раствора кобальта, перемешивают и ставят на белую бумагу рядом с бюреткой для титрования. Таким образом проводят визуальное сравнение окраски исследуемых проб молока или молозива.

Расчет ведут по формуле

$$x = A \cdot 10,$$

где x — кислотность молока (молозива), °Т, что равно числу мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида, затраченного на нейтрализацию кислотности 100 мл молока (молозива); A — количество 0,1 моль/л раствора натрия (калия) гидроксида, пошедшего на титрование 10 мл молока (молозива), мл; 10 — коэффициент для пересчета кислотности в 100 мл молока (молозива).

Клиническое значение. Титруемая кислотность молока (молозива) обусловлена кислотным характером казеина, наличием в нем фосфорнокислых, лимоннокислых солей и растворенного углекислого газа.

У коров, содержащихся на полноценных рационах, кислотность молозива 1-го удоя равна 45—55 °Т, 1-го дня — 39 °Т, 2-го дня — 31 °Т; 3-го дня — 27,3 °Т; 6-го дня — 20,3 °Т; 7-го дня — 19,5 °Т. Низкая кислотность молозива свидетельствует о неполноценном кормлении животных, скармливание такого молозива способствует развитию диспепсии новорожденных телят.

Кислотность свежего молока коровы 16—19 °Т, козы 17 °Т, овцы 23 °Т, буйволицы 18,7 °Т, зебу 19,5 °Т, верблюдицы 17,2 °Т, кобылицы 6—6,5 °Т, ослицы 6 °Т. Этот показатель в основном характеризует свежесть молока, однако при ацидотическом состоянии у животных кислотность молока может повышаться. Титруемая кислотность молока в начале лактации может составлять 20 °Т, постепенно снижаясь в последнем месяце до 12—14 °Т и ниже.

Определение иммунных глобулинов (Ig) в молозиве (молоке) с натрия сульфитом. Принцип. При воздействии на обезжиренное молозиво (молоко) раствора натрия сульфита изменяется структура белковых молекул и раствор мутнеет, его интенсивность пропорциональна концентрации Ig.

Реактивы: 18%-ный раствор натрия сульфита (ч. д. а). 18 г вещества растворяют в 82 мл дистиллированной воды;

10%-ный раствор уксусной кислоты. 10 г ледяной уксусной кислоты (CH_3COOH) растворяют в 90 мл дистиллированной воды.

Оборудование: фотометры КФК-2, КФК-3, ФЭК и др.; мерные колбы; пипетки.

Ход определения. Молозиво (молоко) обезжиривают, отбирают, не затрагивая жира, примерно 2 мл обезжиренного молозива или 7 мл обезжиренного молока. Пробу молозива разбавляют дистиллированной водой в 2—4 раза. В обезжиренном разбавленном молозиве или неразбавленном обезжиренном молоке осаждают казеин и для получения прозрачного слоя центрифугируют или фильтруют через бумажный фильтр.

Для получения прозрачного центрифугата в две центрифужные пробирки вносят по 5 мл обезжиренного, разбавленного молозива или по 3,5 мл обезжиренного молока, по каплям добавляют 10%-ный раствор уксусной кислоты до осаждения казеина, размешивают и через 5—10 мин центрифугируют 10—15 мин при 3000 $мин^{-1}$. Прозрачный фильтрат получают путем фильтрования через бумажный фильтр пробы молозива (молока) после осаждения казеина. В две параллельные пробирки вносят по 3,8 мл 18%-ного раствора натрия сульфита и по 0,1 мл прозрачного фильтрата или центрифугата, смешивают и фотометрируют на ФЭКе, КФК-2 при длине волны 440 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм против раствора натрия сульфита (контроль). Содержание Ig находят по калибровочному графику, построенному по определению Ig в стандартной сыворотке с известной их концентрацией, или пользуясь таблицей М. А. Костыны (1983) (табл. 41).

41. Содержание иммунных глобулинов в зависимости от оптической плотности

Оптическая плотность	Содержание Ig, мг/мл	Оптическая плотность	Содержание Ig, мг/мл	Оптическая плотность	Содержание Ig, мг/мл
0,1	2,28	0,185	4,61	0,80	17,8
0,11	2,60	0,19	4,72	0,85	19,0
0,12	2,92	0,195	4,83	0,90	20,2
0,125	3,03	0,20	4,94	0,95	21,2
0,13	3,14	0,25	5,80	1,00	22,3
0,135	3,37	0,30	6,80	1,05	23,4
0,14	3,60	0,35	8,00	1,10	24,6
0,145	3,70	0,40	9,00	1,15	25,6
0,15	3,80	0,45	10,00	1,20	26,8
0,155	3,93	0,50	11,40	1,25	28,0
0,16	4,06	0,55	12,40	1,30	29,0
0,165	4,17	0,60	13,60	1,35	30,1
0,17	4,28	0,65	14,60	1,40	31,2
0,175	4,39	0,70	15,80	1,45	32,3
0,18	4,50	0,75	16,80	1,50	33,4

Примечание. Изложенной выше методикой можно определять содержание Ig в сыворотке крови животных. В две (параллельные) пробирки вносят по 3,8 мл 18%-ного раствора уксусной кислоты и по 0,1 мл сыворотки, смешивают и колориметрируют при длине волны 400 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 5 мм против 18%-ного раствора уксусной кислоты.

Источник: 20.

Клиническое значение. Содержание Ig в молозиве и молоке зависит от условий кормления и содержания животных, кроме того, от времени удоя после отела (опороса). Кормление беременных животных по рационам с дефицитом протеина, незаменимых аминокислот и других элементов питания, витаминов и микроэлементов, использование недоброкачественных кормов, несоблюдение оптимальной структуры потребления кормов ведет к снижению иммунных белков в молозиве и молоке. В практике наибольшее клиническое значение имеет определение Ig в молозиве, так как от их содержания зависит здоровье новорожденного молодняка.

Потребление молозива с низким уровнем Ig сопровождается слабым насыщением ими организма новорожденных, развитием иммунного дефицита, появлением массовых желудочно-кишечных, легочных заболеваний, в том числе и инфекционной природы.

В полноценном молозиве коров первого удоя содержание Ig составляет 50—100 г/л, в том числе IgG более 85 г/л, во втором удое — 28—56 г/л, или на 45 % меньше, чем в первом, в третьем удое на 75 % ниже, чем в первом, или около 13—25 г/л (L. Slanina, 1991). К седьмому дню после отела молозиво по составу Ig (5—7 г/л) приближается к молоку. В молозиве свиноматок Ig содержится 55—71 г/л (А. Хохлов, 1997).

Неполноценное молозиво содержит значительно меньше Ig, чем полноценное. По нашим данным, в зимне-весенний период в молозиве первого удоя коров, содержавшихся в сухостойный период на неполноценных рационах, уровень Ig составляет 10—15 г/л.

Методы определения соматических клеток в молоке. Для определения содержания соматических клеток в молоке применяют вискозиметр ВМЛК, анализатор молока «Соматос», электронный анализатор качества молока «КЛЕВЕР-1М», прибор ИСКМ-1, «Фоссоматик» и др., проводят подсчет клеток в камере с сеткой Горяева или определяют их примерное количество визуальным способом.

Определение соматических клеток в молоке с применением вискозиметра ВМЛК. Принцип. Метод основан на определении скорости вытекания смеси молока с раствором реактива «Мастоприм» через капилляр прибора, зависящей от содержания соматических клеток в молоке: чем их больше, тем медленнее вытекает жидкость.

Реактив: раствор «Мастоприм». 3,5 г препарата вносят в мерную колбу или в мерный цилиндр на 100 мл и доливают дистилли-

рованной водой, подогретой до 30—35 °С до метки. Перед применением раствор взбалтывают. Годен в течение 1 сут.

Оборудование: вискозиметр ВМЛК; пипетки на 5 и 10 мл; колбы или цилиндры на 100 мл; весы лабораторные рычажные не менее 3-го класса точности, наибольший предел взвешивания 100 г, поверочная цена деления 0,001 г; термометры технические прямые № 4; стаканы химические на 50 и 500 мл.

Ход определения. Температура в лаборатории должна быть 10—30 °С, кислотность исследуемого молока 16—21 °Т. В сосуд вискозиметра вносят 5 мл водного раствора препарата «Мастоприм» массовой концентрации 35 г/л и 10 мл исследуемого молока, тщательно профильтрованного через четыре слоя марли. Нажимают кнопку «Пуск» и перемешивают смесь в течение 30 с. По окончании перемешивания через капилляр вытекает смесь с раствором «Мастоприм». Время вытекания определяют таймером. После анализа смеси сосуд прибора 2—3 раза промывают дистиллированной водой и 4—5 раз продувают с помощью резиновой груши. После очистки сосуда прибор считается подготовленным для исследования последующей пробы молока.

Количество соматических клеток в пробе молока устанавливают по времени вытекания смеси в соответствии с условиями, описанными в таблице 42.

42. Зависимость количества соматических клеток от скорости вытекания смеси молока с реактивом «Мастоприм»

Время вытекания смеси, с	Количество соматических клеток, тыс/мл	Время вытекания смеси, с	Количество соматических клеток, тыс/мл
12,0—18,0	До 300	31,1—37,0	751—1000
18,1—25,0	301—500	37,1—46,0	1001—1250
25,1—31,0	501—750	46,1—58,0	1251—1500

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. При этом разность времени вытекания смеси молока и водного раствора препарата «Мастоприм» через капилляр двух параллельных образцов молока не должна превышать 1—6 с.

Анализатор молока вискозиметрический «Соматос» фирмы ООО «Био Тест» (Украина, г. Донецк) предназначен для определения количества соматических клеток в молоке по условной вязкости, измеряемой по времени вытекания контролируемой пробы через капилляр. Принцип работы этого прибора такой же, как и вискозиметра ВМЛК.

Диапазон определения количества соматических клеток в 1 $см^3$ молока на приборе «Соматос» 90—1500 тыс.; относительная пог-

решность измерения условной вязкости не более 5 %; продолжительность одного анализа не более 4 мин.

Анализатор молока вискозиметрический «Соматос» Научно-производственного объединения «Петролазер» (Россия, Санкт-Петербург) по работе и техническим характеристикам не отличается от описанного выше анализатора.

Источник: 71.

Помимо определения общего количества соматических клеток молока (секрета в сухостойный период) возможна их дифференциация. С этой целью предложен способ приготовления и окраски препаратов из молока и секрета молочных желез для микроскопирования клеток, обеспечивающий окрашивание и сохранение структуры клеточных элементов (К. Н. Кондрахина, Г. А. Симонян. Авторское свидетельство № 400314). К 15—18 мл свежевыдоенного молока (секрета) добавляют одну каплю 40%-ного раствора формальдегида и тщательно перемешивают. Затем отбирают 5 мл молока, вносят в центрифужную пробирку, центрифугируют 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. С поверхности снимают слой жира, выливают надосадочную жидкость, к осадку добавляют 0,5—1,0 мл сыворотки крови крупного рогатого скота и встряхивают до полного взмучивания осадка. После этого доливают сыворотку до объема 3—4 мл и снова центрифугируют в течение 7—8 мин при 3000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость сливают, оставшийся осадок тщательно перемешивают путем встряхивания до полного взмучивания. Пипеткой от гемометра Сали набирают полученную взвесь отмытых клеток, наносят каплю ее на чистое обезжиренное предметное стекло и делают мазок. Высушенный мазок фиксируют метанолом в течение 5 мин и окрашивают краской Романовского, которую готовят перед употреблением на водопроводной воде с pH, близкой к нейтральной (1 капля краски на 1 мл воды). Дифференцируют клетки под микроскопом с окуляром 7 или 10 и объективом 90.

Источник: 36.

Клиническое значение. Подсчет соматических клеток проводят главным образом для выявления маститного молока, а также оценки генетического потенциала продуктивности животных. Содержание соматических клеток у здоровых коров в период выделения нормального молока (285—290 дней) составляет 50—800 тыс/мл. В молоке с примесью молозива или в молоке, полученном в последние 7 дней лактации (стародойное), количество соматических клеток превышает 800 тыс/мл. Сборное молоко высшего сорта содержит не более 400 тыс/мл, молоко высшего сорта — не более 500, первого сорта — до 600 и несортовое — не более 800 тыс/мл соматических клеток.

В сухостойный период количество соматических клеток в секрете здорового вымени увеличивается в десятки и сотни раз. При субклиническом мастите их содержание в молоке колеблется от 0,96 до 16,0 млн/мл; серозном — 1,00—64,0, катаральном — 1,05—23,0, гнойном — 1,50—300 млн/мл (К. Н. Кондрахина).

Большинство ученых считает, что подсчет соматических клеток (в основном лейкоцитов) в молоке — наиболее эффективный и ранний метод выявления скрытых форм мастита.

Определение количества соматических клеток — обязательно, поскольку этот показатель введен в качестве основного при установлении сортности заготавливаемого молока. В молоке выявлена четкая зависимость между увеличением этого показателя и снижением продуктивности. По некоторым данным, при наличии в молоке от 500 тыс. до 1 млн соматических клеток в 1 мл продуктивность коров снижается на 10 %, до 5 млн/мл — на 30 % (ФРГ).

Определение в молоке (молозиве) кетоновых тел, общего кальция, неорганического фосфора, магния, мочевины, витамина А. Перечисленные показатели определяют в обезжиренном молоке (молозиве). [Метод обезжиривания молока (молозива) изложен в начале раздела.]

Определение кетоновых тел в обезжиренном молоке (*молозиве*) проводят ионометрическим методом (см. Исследование крови).

Повышенную концентрацию кетоновых тел в молоке (молозиве) можно установить с помощью специальных тест-пластин, реактива Лестраде, Ланге и других, в основе которых лежит реакция натрия нитропруссида с ацетоуксусной кислотой и ацетоном в щелочной среде с появлением сиреневой окраски. Тест-полоску или реактив смачивают молоком (молозивом) и через 30—40 с оценивают изменение цвета, его интенсивность. Чем интенсивнее цвет, тем выше концентрация кетоновых тел в исследуемой пробе.

Чувствительность методов с натрия нитропруссидом около 10 мг/100 мл. Такая концентрация ацетоновых тел в молоке (молозиве) бывает при развитии кетоза.

Определение кетоновых тел в молоке (*молозиве*) проводят по той же методике, что и при обнаружении их в крови и моче.

Определение общего кальция в обезжиренном молоке (молозиве) можно проводить комплексонометрическим методом с индикатором флуорексоном (см. с. 76) или мурексидом (см. с. 79), *неорганического фосфора* с ванадат-молибденовым реактивом (см. с. 82), с аскорбиновой кислотой (см. с. 84), *магния* — по цветной реакции с титановым желтым (см. с. 86), *мочевины* — по цветной реакции с диацетилмонооксимом (см. с. 100).

Витамин А в цельном молоке (молозиве) определяют по методу Бессея в модификации А. А. Анисимовой и В. И. Левченко (см. с. 186).

Клиническое значение. Показатели молока и молозива здоровых коров приведены в приложении 9.

Нами (И. П. Кондрахин) установлено, что содержание кетоновых тел и мочевины в молоке и молозиве коров находится в прямой зависимости от содержания этих веществ в крови. При этом концентрация кетоновых тел и мочевины в крови и молоке иден-

тична. Резкое повышение кетоновых тел в молозиве и молоке (выше 10—12 мг%) отмечается при острой стадии кетоза, которая обычно бывает в первые 100 дней лактации. В последующем, при переходе острой формы кетоза в хроническую, уровень кетоновых тел приближается к верхней границе нормы (8 мг%). При заболевании коров кетозом содержание мочевины в молоке снижается, что связано, очевидно, с уменьшением мочевинообразовательной функции печени. Таким образом, показатели кетоновых тел и мочевины в молозиве и молоке могут служить диагностическими тестами при кетозе. Концентрация мочевины в молоке и молозиве повышается при поступлении в организм больших количеств нитратного азота.

Содержание витамина А в молозиве и молоке также находится в прямой зависимости от концентрации его в крови. Поэтому степень обеспеченности организма витамином А можно оценивать по концентрации его в молозиве и молоке.

Что касается кальция, неорганического фосфора, магния, то содержание их в молозиве и молоке имеет меньшее клиническое значение, предпочтение отдается определению их в сыворотке крови.

4.2. КЛИНИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЧИ

Исследование мочи — неотъемлемая часть в комплексе методов при постановке диагноза, контроля за эффективностью лечения животных. В моче в ряде случаев происходят изменения раньше, чем в крови. Ее физические, химические, цитологические изменения отражают состояние не только мочевой системы, но и печени, сердца и других органов, а также кислотно-щелочного равновесия в организме.

Образцы мочи берут от животных в утренние часы при самопроизвольном или вызванном рефлекторно специальными приемами мочеиспускании. В редких случаях делают катетеризацию мочевого пузыря, а у собак и кошек возможен цистоцентоз. У пушных зверей при клеточном их содержании мочу собирают в подвешенные под клетку чистые эмалированные кюветы. Для уменьшения степени ее загрязнения кювету покрывают марлей или сеткой.

Собранную мочу фильтруют. В исключительных случаях мочу консервируют раствором хлороформа (0,6 мл на 100 мл воды) — 2—3 мл на 10 мл мочи; тимолом — 1 кристаллик тимола на 100 мл мочи; жидкостью Мюллера (10 г натрия сульфата, 25 г калия бихромата на 100 мл воды) — 1 мл на 20 мл мочи. Образцы мочи можно заморозить. Анализ неконсервированной мочи проводят в течение 1,5 ч от момента ее взятия. При исследовании уробилиногена мочу защищают от прямого солнечного света.

В образцах мочи не должно быть истечений из половых органов.

Определение физических свойств мочи. Физические свойства мочи (цвет, прозрачность, запах, относительная плотность) имеют видовую особенность. У жвачных моча от светло-желтого до светло-коричневого цвета, прозрачная. У лошадей моча от бледно-желтого до бурого цвета, слизистой консистенции из-за примеси большого количества муцина. При стоянии в ней появляется тонкая известковая пленка вследствие образования нерастворимого кальция карбоната ($CaCO_3$) из кальция гидрокарбоната [$Ca(HCO_3)_2$]. У свиней моча светло-желтая, прозрачная. У плотоядных — светло-желтая или желтая, прозрачная.

Цвет мочи меняется от присутствия различных красящих элементов, поступающих в организм с кормом, лекарственными препаратами, настоями (отварами) лекарственных трав. Изменение цвета мочи характеризует определенные патологические состояния или болезни. Зелено-бурую окраску моча приобретает вследствие появления в ней билирубина при болезнях печени. Наличие в моче эритроцитов (гломерулонефрит, мочекаменная болезнь), гемоглобина (гемоглобинурия), миоглобина (паралитическая миоглобинурия) придает ей красный или темно-коричневый цвет. Темно-желтый цвет мочи отмечается при сердечной недостаточности (застой крови в почках), рвоте, диарее; бледный — при несахарном и сахарном диабете; темный — при отравлении гемолитическими ядами, гемоспоридиозах.

Прозрачность мочи. Свежесобранная моча здоровых животных прозрачная. Выраженное помутнение мочи вызывает наличие в ней форменных элементов крови, жира, эпителия, бактерий, высокой концентрации уратов, фосфатов, оксалатов. При стоянии мочи на холоде ее помутнение обусловлено выпадением уратов, в тепле — фосфатов. Однако цвет и прозрачность мочи еще не свидетельствуют об отсутствии заболеваний мочевой системы и других органов.

Запах мочи. Свежая моча имеет специфический запах, свойственный животным определенного вида. После стояния она приобретает слабый аммиачный запах, обусловленный щелочным брожением. Аммиачный запах свежей мочи свидетельствует о воспалении мочевого пузыря. Запах ацетона появляется при кетозе коров и суягных овцематок, при тяжелом течении сахарного диабета (кетоацидоз). Гнилостный запах мочи появляется при гнилостных или гангренозных процессах в мочевом пузыре и почечной лоханке.

Относительная плотность мочи. Относительная плотность мочи — это показатель, отражающий содержание растворимых в моче веществ (мочевины, мочевой кислоты, креатинина, различных солей) и способность почек к концентрированию и разведению мочи.

Относительную плотность мочи измеряют с помощью ареометра (урометра) с диапазоном шкалы от 0,001 до 1,050. В цилиндр вместимостью 50 мл наливают мочу комнатной температуры, избе-

гая образования пены, затем в нее осторожно опускают урометр. После прекращений его колебаний отмечают относительную плотность по положению нижнего мениска на шкале урометра. Урометр не должен касаться стенок цилиндра. У мелких животных, когда мочи бывает мало, ее можно развести в 2—3 раза дистиллированной водой и последние после единицы цифры умножить на степень разведения. Нормативы относительной плотности мочи приведены в таблице 43.

43. Относительная плотность мочи, г/мл или кг/л

Вид животного	Плотность мочи	Вид животного	Плотность мочи
Крупный рогатый скот	1,02—1,055	Кошка	1,020—1,040
		Кролик	1,010—1,045
Овца и коза	1,015—1,065	Лисица	1,016—1,040
Лошадь	1,025—1,055	Песец	1,018—1,034
Верблюд	1,030—1,060	Норка	1,040—1,060
Свинья	1,018—1,022		
Собака	1,018—1,022		

Относительная плотность мочи зависит от корма (жидкий, сухой), количества выпитой воды, потоотделения и многих других факторов. Увеличение относительной плотности мочи отмечают при недостаточном поении животных, усиленном потоотделении в жаркий период года, тяжелой работе, лихорадке, изнурительном поносе, выделении с мочой белка, сахара и других веществ в повышенном количестве. Низкая плотность мочи обусловлена ослаблением концентрирующей или выделительной функции почек, возникающей, например, при несахарном диабете, нефросклерозе или при других заболеваниях почек, сопровождающихся нарушением выделения мочевины или натрия хлорида — основных растворимых в моче веществ. При развитии хронической почечной недостаточности способность почек к осмотическому концентрированию постепенно утрачивается, относительная плотность мочи понижается.

Химическое исследование мочи. Оно включает определение реакции (pH), обнаружение и определение белка, глюкозы, уробилинов, кетоновых тел и других веществ.

Определение pH. Концентрация свободных H^+-ионов — показатель истинной реакции мочи — активной кислотности (pH). Определяют pH в свежеполученной моче с помощью универсальной индикаторной бумаги, тест-пластин или (точно) потенциометром (pH-метр). Универсальная индикаторная бумага дает возможность определять pH в диапазоне от 1,0 до 10,0. Некоторые фирмы выпускают индикаторную бумагу специальных видов, предназначенную для определения pH мочи в диапазоне от 5,0 до 8,0, или ком-

бинированные экспресс-тесты (бумажные или пластиковые полоски), которые включают кроме определения величины pH несколько других показателей. Индикаторную бумагу или комбинированные экспресс-тесты (экспресс-полоски) смачивают мочой и немедленно сравнивают появившуюся окраску со стандартной цветной шкалой. При использовании ионометра руководствуются соответствующей инструкцией.

При стоянии pH мочи сдвигается в щелочную сторону из-за распада азотистых соединений, выделения аммиака, соединения его с водой и образования щелочи, а также распада клеточных элементов.

Клиническое значение. В норме pH мочи у крупного рогатого скота 7,0—8,6, у лошадей 7,0—8,5, у овец и коз 7,0—8,5, у свиней 6,0—7,3, у собак и кошек 5,0—6,5. У молодняка молочного периода pH мочи немного ниже, чем у взрослых.

Моча приобретает кислую реакцию при содержании животных на высококонцентратных рационах, при ацидозе рубца, сахарном диабете, кетозе, хронической сердечной недостаточности, лихорадочных состояниях, миоглобинурии, остром гломерулонефрите, голодании, изнурительном поносе, почечной недостаточности, гипокалиемическом алкалозе (недостаток калия увеличивает секрецию H^+-ионов почечными канальцами). Мочу щелочной реакции наблюдают при алкалозе рубца, хронических инфекциях мочевыводящих путей вследствие бактериально-аммиачного брожения (цистит, уроцистит, пиелонефрит).

Обнаружение белка и количественное определение его. Обнаружение белка в моче достигается пробой с сульфасалициловой кислотой, кипячением или использованием специальных экспресс-тестов.

Проба с сульфасалициловой кислотой. Принцип. Проба основана на коагуляции белка с кислотой.

Реактивы: 20%-ный раствор сульфасалициловой кислоты.

Ход определения. В пробирку вносят 3—4 мл профильтрованной мочи и 5—6 капель 20%-ного раствора сульфасалициловой кислоты. Появление хлопьев или помутнения в пробе указывает на наличие белка (положительная проба). Чувствительность пробы 0,015 г/л.

Обнаружение белка в моче можно провести специальной тест-бумагой, содержащей буфер и индикатор, изменяющий в присутствии белка окраску от желтой к слабо-зеленой и зеленой.

Чувствительность около 0,06 г/л альбумина. Мультитестовые полоски могут быть использованы для обнаружения в моче альбумина, который появляется при нефропатиях.

Определение белка методом Брандберга—Робертса—Стольникова. Принцип. В основу метода положена кольцевая проба Геллера, заключающаяся в том, что на границе азотной кислоты и мочи при наличии белка происходит его коагуляция и появляется белое кольцо.

Реактивы: 30%-ный раствор азотной кислоты (относительная плотность 1,2) или реактив Ларионовой. 20—30 г натрия хлорида растворяют при нагревании в 100 мл дистиллированной воды, дают остыть, фильтруют и к 99 мл фильтрата добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты.

Ход определения. В пробирку вносят 1—2 мл азотной кислоты (или реактива Ларионовой) и осторожно по стенке пробирки наслаивают такое же количество профильтрованной мочи. Появление тонкого белого кольца на границе двух жидкостей между 2—3 мин указывает на наличие белка в концентрации 0,033 г/л. Если кольцо появляется раньше чем через 2 мин после наслаивания, мочу разводят водой и повторяют исследование. Степень разведения подбирают в зависимости от вида кольца (ширины, компактности, времени появления): при нитевидном кольце, появившемся ранее 2 мин, мочу разводят в 2 раза, при широком — в 4 раза, при компактном — в 8 раз. Разведение подбирают так, чтобы при повторном наслаивании кольцо образовалось между 2—3 мин. Концентрацию белка находят путем умножения 0,033 на степень разведения.

Примечание. Белое кольцо может образоваться в присутствии большого количества уратов; в отличие от белкового уратное кольцо появляется несколько выше границы раздела и растворяется при слабом нагревании.

Турбидиметрический метод с сульфасалициловой кислотой. Принцип. Сульфасалициловая кислота вызывает коагуляцию белков с образованием мутности, интенсивность которой пропорциональна концентрации белка в моче.

Реактивы: 3%-ный раствор сульфасалициловой кислоты;

0,9%-ный раствор натрия хлорида;

калибровочный 1%-ный раствор альбумина. 1 г лиофилизированного альбумина (из бычьей или человеческой сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9%-ного раствора хлорида натрия в колбе на 100 мл и доводят до метки тем же раствором, стабилизируют 1 мл 5%-ного раствора натрия азида. При хранении в холодильнике годен 2 мес.

Оборудование: фотоэлектроколориметр.

Ход определения. В 2 пробирки (опытная и холостая пробы) вносят по 1,25 мл профильтрованной мочи, приливают к опытной пробе до 5 мл 3%-ного раствора сульфасалициловой кислоты, к холостой пробе — до 5 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида, перемешивают. Через 5 мин измеряют экстинкцию опытной пробы на ФЭКе при длине волны 590—650 нм (оранжевый или красный светофильтр) против холостой пробы в кювете с толщиной слоя 5 мм.

Расчет ведут по калибровочному графику с концентрацией белка в растворах от 0,05 до 1,0 г/л. Приготовление растворов калибровочного графика приведено в таблице 44.

44. Приготовление растворов

№ пробирки	Стандартный раствор альбумина, мл	0,9%-ный раствор натрия хлорида, мл	Концентрация белка, г/л
1	0,05	9,95	0,05
2	0,1	9,9	0,1
3	0,2	9,8	0,2
4	0,5	9,5	0,5
5	1,0	9,0	1,0

Калибровочная кривая линейна до концентрации 1 г/л. Мочу с более высокой концентрацией белка разводят водой и при расчетах учитывают степень разведения. Этот метод непригоден для определения белка в моче, содержащей контрастные вещества, большое количество мочевой кислоты.

Концентрацию белка в моче можно определять биуретовым методом (см. Исследование крови).

Клиническое значение. Различают протеинурию преренальную, связанную с усиленным распадом белка тканей (паралитическая миоглобинурия), выраженным гемолизом (гемоспоридиозные болезни, отравления гемолитическими ядами); ренальную, обусловленную патологией почек, которая разделяется на клубочковую и канальцевую; постренальную, связанную с патологией мочевыводящих путей.

Появление в моче большого количества белка обусловлено прежде всего повышением фильтрации белков через клубочковый капиллярный фильтр, а также снижением их канальцевой реабсорбции. Протеинурия, связанная с нарушением клубочковой проницаемости (клубочковая протеинурия), наблюдается при большинстве заболеваний почек — первичных и вторичных гломерулонефритах, вторичном амилоидозе почек, диабетическом гломерулосклерозе, тромбозе почечных вен, атеросклеротическом нефросклерозе. Временная, коротко протекающая протеинурия наблюдается при лихорадочных и острых токсических поражениях почек.

Длительная протеинурия характерна для хронического гломерулонефрита, вторичного амилоидоза почек; может наблюдаться месяцами и годами.

Функциональная протеинурия наблюдается при беременности, большой физической нагрузке, перегревании, переохлаждении, дегидратации, стрессе. Она связана с влиянием этих факторов на почечную гемодинамику, в результате чего повышается проницаемость гломерулярных капилляров. Она исчезает после устранения причин, ее вызывающих. Канальцевая протеинурия — результат нарушения процессов реабсорбции белков первичной мочи (ультрафильтрата). Она характерна для хронических интерстициаль-

ных нефритов, вызванных отравлением солями свинца, ртути, острой почечной недостаточностью.

Смешанная протеинурия обусловлена сочетанием гломерулярных и тубулярных механизмов, имеющих место при гломерулонефритах, диабетической нефропатии, пиелонефрите и вторичном амилоидозе почек.

Инфраренальная (секреторная) протеинурия обусловлена повышенной секрецией разных белков клетками тубулярного эпителия, а также слизистой оболочкой и железами мочеполовых органов, наблюдаемой при пиелонефрите, интерстициальном нефрите, простатите. Протеинурия сочетается с патологическими изменениями осадка мочи.

Обнаружение билирубина. Для обнаружения билирубина в моче используют пробы Фуше, Розина, Готфрида, полоски Билуген-тест и др. Образцы утренней мочи оберегают от действия прямого солнечного света. Обнаружение билирубина в моче в большинстве проб основано на его превращении под действием окислителя в зеленый биливирдин или другие соединения определенного цвета.

Проба Фуше. Принцип. Метод основан на окислении билирубина железа хлоридом в биливирдин и появлении зеленовато-синего или голубоватого окрашивания.

Реактивы: 15%-ный раствор бария хлорида;

реактив Фуше. 25 г трихлоруксусной кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды и приливают 10 мл 10%-ного раствора хлорного железа ($FeCl_3$).

Ход определения. К 10—12 мл мочи прибавляют 5 мл 15%-ного раствора бария хлорида, смешивают, фильтруют. На вынутый из воронки и расправленный на сухой фильтровальной бумаге или в чашке Петри фильтр наносят 2—3 капли реактива Фуше. Появление на фильтре сине-зеленых пятен свидетельствует о присутствии билирубина. Если реакция мочи щелочная, то необходимо подкислить ее несколькими каплями уксусной кислоты.

Проба Розина. Реактив: 1%-ный спиртовый раствор йода.

Ход определения. В пробирку наливают 4—5 мл мочи и осторожно по стенкам пробирки наслаивают раствор йода. Появление на границе между жидкостями зеленого кольца свидетельствует о наличии билирубина.

Проба Готфрида. Принцип. Связанный с глюкороновой кислотой билирубин при соединении с диазотированной сульфаниловой кислотой (диазобензосульфоновая кислота) дает розовую окраску.

Реактивы: 10%-ный раствор хлорида бария;

диазореактив: а) диазораствор I: 5 г сульфаниловой кислоты растворяют в небольшом количестве воды, прибавляют 15 мл концентрированной HCl и доливают до 1000 мл дистиллированной водой; б) диазораствор II: 0,5%-ный раствор натрия нитрата. Непосредственно перед определением смешивают 10 мл диазореактива I и 0,25 мл диазореактива II;

96%-ный спирт этиловый;

6%-ный раствор двузамещенного натрия фосфата.

Ход определения. К 10 мл мочи, подкисленной несколькими каплями уксусной кислоты, прибавляют 5 мл 10%-ного раствора бария хлорида, перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр. Фильтр раскладывают на дне чашки Петри и на осадок капают 1—2 капли свежеприготовленной диазосмеси, 4 капли спирта и 1 каплю двузамещенного натрия фосфата. При наличии в моче билирубина появляется красно-фиолетовая окраска.

Примечание. Мешают обнаружению билирубина высокие концентрации в моче уробилиноидов, индикана, нитритов, аскорбиновой кислоты, фенотиозина.

Тест на билирубин с использованием полосок Билуген-тест или мультитестовых полосок. Основан на соединении билирубина со стабильной солью диазония (2,6-дихлорбензендиазония флуоборат) в кислой среде с образованием красно-фиолетового окрашивания. Цвет изменяется до фиолетового, причем интенсивность нарастает соответственно концентрации билирубина. Предел чувствительности — 0,5 г/100 мл (9 мкмоль/л) билирубина в моче, не содержащей аскорбиновой кислоты.

Оценка реакции. Наличие билирубина в моче дает переход окраски от белой к розово-бежевой или светло-красно-фиолетовой. Легкое розовое окрашивание принимается за положительную пробу. Другие компоненты мочи, дающие желтоватую окраску, могут слегка изменять оттенок окрашивания. Сравнение окрашивания по шкале: − отрицательный результат; +− слабоположительный; ++ умеренно положительный; +++ сильно положительный результат.

Примечание. Длительное хранение мочи, особенно на свету, вызывает окисление билирубина и ложноотрицательные результаты. Ложноположительные результаты могут быть вызваны лекарствами, окрашивающими мочу в красный цвет.

Клиническое значение. У здоровых животных билирубин в моче качественными пробами не обнаруживают. При болезнях печени и желчных путей в моче появляется билирубинглюкоронид (связанный с глюкороновой кислотой билирубин — водорастворимый). Билирубинурию наблюдают при гепатите (паренхиматозная желтуха), застое желчи в желчном пузыре и желчных протоках — холестазе (желчнокаменная болезнь, холецистит). Так как несвязанный (непрямой) билирубин водонерастворимый и не проходит через почечный фильтр, то для гемолитической желтухи (гемоспоридиозные болезни, отравления гемолитическими ядами) билирубинурия не характерна.

Обнаружение и определение уробилиноидов (уробилина, уробилиногена). **Проба Флоренса.** Принцип. С кислотой хлористоводородной уробилин образует соединение, окрашенное в красный цвет.

Реактивы: серная кислота концентрированная; диэтиловый эфир; кислота хлористоводородная концентрированная.

Ход определения. В пробирку вносят 8—10 мл мочи, подкисляют 8—10 каплями концентрированной серной кислоты, перемешивают, затем приливают 2—3 мл эфира, закрывают пробкой, несколько раз осторожно пропускают эфир через слой мочи для экстрагирования уробилина. Затем эфирную вытяжку мочи наслаивают лучше пастеровской пипеткой на 2—3 мл концентрированной кислоты хлористоводородной и помещают в другую пробирку. При наличии уробилина на границе жидкости образуется розовое кольцо. Проба очень чувствительная.

Проба Богомолова. Принцип. Уробилин с меди сульфатом образует соединение красно-розового цвета.

Реактивы: насыщенный раствор меди сульфата ($CuSO_4 \times 5H_2O$, ч. д. а.). 23 г вещества растворяют в 100 мл дистиллированной воды;

хлороформ.

Ход определения. В пробирку вносят 10—15 мл мочи, 2—3 мл насыщенного раствора меди сульфата. При появлении помутнения прибавляют несколько капель концентрированной кислоты хлористоводородной до просветления смеси. Через 5 мин приливают 2—3 мл хлороформа, пробирку закрывают пробкой и несколько раз встряхивают. При окрашивании хлороформа в розовый цвет реакция положительная.

Примечание. Обнаружению уробилиноидов мешают билирубин и гемоглобин. В случае их нахождения в моче ее предварительно готовят следующим образом. К 10—12 мл мочи добавляют 5—6 мл 10%-ного раствора бария хлорида ($BaCl_2$) и фильтруют. Затем фильтрат проверяют на полноту осаждения билирубина. Процедуру повторяют до полного осаждения билирубина.

Проба Нейбауера. Принцип. Проба основана на реакции между уробилиногеновыми телами и реактивом Эрлиха с образованием соединения красной окраски.

Реактив: реактив Эрлиха: 2 г *пара*-диметиламинобензальдегида растворяют в 100 мл 20%-ного раствора кислоты хлористоводородной.

Ход определения. К нескольким миллилитрам свежей охлажденной до комнатной температуры мочи прибавляют несколько капель реактива Эрлиха. Окрашивание жидкости в первые 30 с свидетельствует о положительной пробе, а появление окраски по истечении 30 с — о нормальном количестве или отсутствии уробилиногенов.

Обнаружение уробилиногена мультитестовыми полосками или Ламбуген-тестом. Принцип. Стабильная соль диазония (4-метоксибензенедиазоний флиоборат) реагирует немедленно с уробили-

ногеном в кислой среде с появлением окраски. Тест очень чувствителен; предел чувствительности 0,4 мг/100 мл (7 мкмоль/л). Другие вещества мочи не влияют на реакцию. Ложноположительные результаты получают от присутствия в моче феназопиридина.

Присутствие в моче уробилиногена оценивается по изменению цвета от белого до красного через 10 с.

Клиническое значение. Уробилиногенные тела — производные билирубина. Из попавшего в кишечник с желчью связанного билирубина под действием бактерий образуются уробилиноиды (уробилиногены, уробилины, стеркобилиногены, стеркобилины). Уробилиноиды выделяются с калом, часть их реабсорбируется из кишечника в кровь, через систему воротной вены поступает в печень и разрушается. Небольшое количество этих веществ по системе геморроидальных вен, минуя печень, выделяется с мочой. Выделение уробилиноидов с мочой в большом количестве носит название уробилинурии (уробилиногенурия). Уробилинурию отмечают при гепатите, циррозе печени, гемолитической анемии и других гемолитических состояниях, кишечной непроходимости, запоре.

Обнаружение крови и кровяных пигментов. Кровяные пигменты (гемоглобин, метгемоглобин, сульфгемоглобин, гемосидерин), миоглобин обнаруживают бензидиновой пробой, пробой с аммония сульфатом, тест-бумагой и др.

Бензидиновая проба. Принцип. Обнаружение кровяных пигментов путем гемолиза эритроцитов и освобождение из него гемоглобина, который способен отнимать водород от амидоперина, бензидина, гвояколовой смолы и других органических соединений и переносить его на пероксид водорода с образованием окрашенных соединений. Кровяные пигменты извлекаются эфиром.

Реактивы: этиловый эфир;

5%-ный раствор бензидина в ледяной уксусной кислоте; свежий пероксид водорода;

ледяная уксусная кислота;

этиловый спирт.

Ход определения. Готовят эфирную вытяжку мочи: к 10—15 мл добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 8 мл этилового эфира и 1 каплю этилового спирта, взбалтывают и дают постоять. К 2 мл эфирной вытяжки мочи добавляют 5 капель 5%-ного раствора бензидина в ледяной уксусной кислоте и 8—10 капель пероксида водорода. При наличии крови в моче раствор окрашивается в зеленый цвет.

Проба с гвояколовой смолой. Принцип. Тот же, как и в предыдущем методе.

Реактивы: этиловый спирт;

свежеприготовленный насыщенный раствор гвояколовой смолы в этиловом спирте;

пероксид водорода;

этиловый спирт.

Ход определения. Подготовка эфирной вытяжки мочи такая же, как указано в предыдущей пробе.

К 2 мл эфирной вытяжки мочи добавляют 6 капель спиртового свежеприготовленного насыщенного раствора гвояколовой смолы и 8 капель свежего пероксида водорода. Появление через 5—8 мин синего окрашивания свидетельствует о наличии в моче крови.

Обнаружение крови по тест-бумаге. Принцип. Тест основан на том, что гемоглобин и миоглобин катализируют окисление окрашенного индикатора с помощью органического пероксида водорода (2,5-диметил-2,5-дигидропероксигексан) с образованием сине-зеленого окрашивания, которое кажется зеленым на желтой тест-бумаге. Неповрежденные эритроциты гемолизируются на тест-бумаге, гемоглобин осаждается и запускает реакцию, которая вызывает по соседству с каждым эритроцитом появление видимых зеленых точек.

Чувствительность пробы очень высокая — 5 эритроцитов в 1 мкл или количество гемоглобина, освобожденное из 10 эритроцитов. Тест специфичен к гемоглобину и миоглобину.

Примечание. Нельзя применять формалин в качестве консерватора мочи. Протеинурия может уменьшить окраску, вызванную гемоглобином.

Клиническое значение. Моча здоровых животных дает отрицательную реакцию на кровяные пигменты. Положительная реакция на них может быть в результате появления в моче крови, гемоглобина, миоглобина. Гематурия наблюдается при гломерулонефрите, мочекаменной болезни, цистите. Гемоглобинурию наблюдают при гемолитических состояниях (кровопаразитарные болезни, отравление гемолитическими ядами), тяжелых инфекционных болезнях.

Проба на миоглобин. Принцип. Метод основан на осаждении гемоглобина аммония сульфатом и способности миоглобина при этом окрашиваться в красно-коричневый цвет.

Реактив: аммония сульфат кристаллический.

Ход определения. В 5 мл мочи растворяют 2,8 г аммония сульфата, смесь фильтруют. Если фильтрат приобретает красно-коричневый цвет, значит, в моче имеется миоглобин, а если фильтрат не окрашен — присутствует гемоглобин.

Моча здоровых животных не содержит миоглобина. Появление миоглобина в моче наблюдается при паралитической миоглобинурии, травмах мышц.

Обнаружение индикана. **Проба Обермайера.** В пробирку вносят 5 мл мочи и 6 мл раствора железа хлорида (0,2—0,4 г железа хлористого растворяют в 100 мл концентрированной соляной кислоты). Через 5 мин в пробирку добавляют 1—2 мл хлороформа, содержимое встряхивают. При наличии индикана хлороформ в нижней части пробирки окрашивается в синий цвет.

Проба Яффе. Реактивы: концентрированная серная кислота; хлороформ; 2%-ный раствор калия перманганата.

Ход определения. В пробирку вносят по 2—3 мл профильтрованной мочи, концентрированной соляной кислоты и хлороформа и 1—2 капли 2%-ного раствора калия перманганата. Пробирку несколько раз переворачивают. Оценивают реакцию после оседания хлороформа. При наличии индикана хлороформ окрашивается в голубой или розовый цвет.

Клиническое значение. В моче здоровых животных индикан содержится в небольшой концентрации, которую качественными реакциями не обнаруживают. Повышенное содержание индикана в моче (индиканурия) наблюдают при интенсивном гниении белков в кишечнике (копростаз, непроходимость кишечника и др.) или при распаде мышц и других тканей.

Обнаружение и определение глюкозы. **Проба Гайнеса.** Принцип. Метод основан на способности глюкозы восстанавливать в щелочной среде при нагревании гидрат оксида меди (синего цвета) в гидрат закиси меди (желтого цвета) и закись меди (красного цвета). Чтобы из гидрата оксида меди не образовался черный осадок оксида меди, к реактиву добавляют глицерин, который связывает гидрат оксида меди.

Реактивы: а) 13,3 г меди сульфата ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, х. ч.) растворяют в 400 мл дистиллированной воды;

б) 50 г натрия (калия) гидроксида растворяют в 400 мл дистиллированной воды;

в) 15 г глицерина (ч. или ч. д. а.) растворяют в 200 мл дистиллированной воды.

Растворы «а» и «б» смешивают и тотчас же добавляют раствор «в». Реактив длительно сохраняется в холодильнике.

Ход обнаружения. *Вариант 1.* К 6—8 мл мочи прибавляют 20 капель реактива до появления голубоватой окраски, смешивают и нагревают верхнюю часть пробирки до начала кипения. Нижняя часть пробирки — контроль. При наличии глюкозы в верхней части пробирки в моче появляется желтая окраска.

Вариант 2. В пробирку вносят 3—4 мл реактива, 8—12 капель мочи. Кипятят или нагревают до кипения. При наличии глюкозы в моче раствор становится желто-бурым. Чувствительность пробы около 0,03 %.

Глюкозу в моче можно определить специальными мультитестированными полосками. Обнаружение глюкозы основано на специфической глюкозо-оксидазно-пероксидазной реакции. Окраска изменяется от желтой (норма) через светло-зеленую в темно-зеленую. Чувствительность в образце мочи, не содержащей аскорбиновой кислоты, около 40 мг/100 мл (2,2 ммоль/л). Результат сравнивают со шкалой через 60 с.

Количественное определение глюкозы в моче. Определение глюкозы в моче возможно по цветной реакции с ортотолуидином (см. Определение глюкозы в крови) или поляриметрическим методом.

Поляриметрический метод. Принцип. Метод основан на использовании свойства раствора глюкозы вращать плоскость поляризованного луча вправо. Угол вращения пропорционален концентрации глюкозы в растворе.

Реактивы: 30%-ный раствор свинца ацетата (свинец уксуснокислый).

Оборудование: поляриметр.

Ход определения. Моча не должна содержать белок; если он имеется, то мочу кипятят и фильтруют. Мочу обесцвечивают: к 10 мл ее добавляют 1 мл 30%-ного раствора свинца ацетата, подкисленного несколькими каплями уксусной кислоты, перемешивают и фильтруют. Исследование проводят в кислой среде, так как в щелочной свинец осаждает глюкозу. Глюкоза в моче стабильна при комнатной температуре и 4—8 °С в течение 2 ч, при минус 20 °С — в течение 48 ч.

Трубку поляриметра наполняют прозрачным фильтратом, избегая попадания пузырьков воздуха, накрывают шлифованным стеклом, помещают в аппарат и через 2—3 мин проводят последующие операции, руководствуясь инструкцией к прибору. Работу прибора проверяют по свежеприготовленному раствору глюкозы с известной концентрацией.

Примечание. Определению глюкозы в моче мешают β-оксимасляная кислота, стрептомицин, препараты тетрациклинового ряда.

Клиническое значение. В моче здоровых животных концентрация глюкозы ничтожно мала и обнаружить или определить ее невозможно. Повышение содержания глюкозы в моче (глюкозурия) отмечается при сахарном диабете, нарушении почечной фильтрации (почечная глюкозурия, «почечный диабет»), поражении печени, стрессах, гипертиреозе и многих других патологических состояниях. Наибольшее клиническое значение имеет контроль глюкозы в моче при диагностике и лечении сахарного диабета.

Обнаружение кетоновых тел. У здоровых животных в моче содержится незначительное количество кетоновых тел (β-оксимасляная и ацетоуксусная кислоты, ацетон), которое качественными реакциями не обнаруживается. Для обнаружения кетоновых тел в моче при их концентрации выше 10—12 мг/100 мл используют пробу Лестраде, Ланге, Ротера, экспресс-тест, кетур-тест, мультитестовые полоски, основанные на тесте Легала и др.

Принцип. Натрия нитропруссид в щелочной среде реагирует с кетоновыми телами, прежде всего с ацетоуксусной кислотой и ацетоном, с появлением окрашивания от сиреневого до темно-фиолетового. При этом чем больше в моче ацетоновых тел, тем интенсивнее окраска.

Проба Лестраде. Реактивы: 1 г натрия нитропруссида $[Na_2(FeCNO_2)(CN)_5 \cdot 2H_2O]$;

20 г аммония сульфата $[(NH_4)_2SO_4]$;

20 г натрия карбоната (Na_2CO_3) безводного.

Компоненты мелко измельчают в фарфоровой ступке в однородный порошок, который помещают в склянку из темного стекла с пробкой. Хранят 1—2 мес.

Ход определения. Исследуют свежеполученную мочу на ферме или в лаборатории. На фильтровальную бумагу на кончике скальпеля наносят реактив и смачивают несколькими каплями мочи, через 30 с учитывают результат. Появление сиреневой, красной или темно-фиолетовой окраски свидетельствует о наличии в моче повышенной или высокой концентрации ацетоновых тел.

Проба Ланге. Реактивы: раствор натрия нитропруссида 5 г/100 мл. Готовят перед употреблением;

уксусная кислота концентрированная;

25 %-ный раствор аммиака водного (NH_4OH).

Ход определения. Исследуют мочу не позже чем через 3 ч после ее получения. В пробирку вносят 3—5 мл мочи, приливают 5—10 капель раствора натрия нитропруссида и 0,5 мл уксусной кислоты, смешивают и осторожно по стенке пробирки пипеткой наслаивают 2—3 мл водного раствора аммиака. Пробу считают положительной, если в течение 3 мин на границе сред образуется красно-фиолетовое кольцо.

Обнаружение кетоновых тел с помощью кетур-теста, мультитестовых полосок или специальных таблеток проводят по инструкции, прилагаемой к набору.

Экспресс-метод заключается в том, что таблетку помещают на фильтровальную бумагу и смачивают несколькими каплями мочи. Через 2 мин окраску таблетки сравнивают с цветной шкалой. Наличие ацетона вызывает фиолетовое окрашивание разной интенсивности. Согласно шкале, реакцию оценивают как слабоположительную, положительную и резко положительную.

При использовании кетур-теста и мультитестовых полосок в моче обнаруживают ацетоуксусную кислоту в концентрации 5 мг/100 мл и выше, ацетон 40—70 мг/100 мл и более. Положительной пробой считают изменение окраски от бежевой до фиолетовой. Сравнение со шкалой дает ориентировочную оценку содержания ацетоуксусной кислоты, равного: (+) — около 5—40 мг/100 мл; (++) — около 40—100 мг/100 мл; (+++) — 100 мг/100 мл и выше.

Клиническое значение. Кетоновые тела не имеют почечного порога и выделяются с мочой в степени, пропорциональной нарастанию концентрации их в крови. Обнаружение кетоновых тел в моче является наиболее доступным и ранним тестом диагностики кетоза у коров, овцематок, буйволиц. При кетозе концентрация кетоновых тел в моче нарастает главным образом за счет ацетоуксусной кислоты и ацетона, которые вступают в реак-

цию с натрия нитропруссидом. Наиболее высокая концентрация кетоновых тел в моче (около 800—1000 мг/100 мл) отмечается при остром тяжелом течении кетоза (И. П. Кондрахин). Кетоновые тела в моче в высокой концентрации обнаруживают при тяжелом течении сахарного диабета (кетоацидоз). Незначительное повышение кетоновых тел в моче можно установить при задержании последа, тяжелой хирургической инфекции и некоторых других патологических состояниях. При этом повышение кетоновых тел идет преимущественно за счет β-оксимасляной кислоты.

Исследование мочевого осадка. Исследуют утреннюю порцию мочи. Готовят осадок путем центрифугирования 10 мл мочи 10 мин при 3000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость осторожно сливают, осадок переносят на предметное стекло и покрывают покровным, изучают вначале под малым увеличением микроскопа (8 × 10), а затем при большом увеличении (10 × 40), изучая форменные элементы крови, цилиндры, кристаллы солей.

Если исследование мочи нельзя провести в течение 20 мин после взятия, то в пробу добавляют консервант из расчета на 10 мл 0,5 мл уксусной кислоты, 1 кристалл тимола или 1 каплю 40%-ного раствора формальдегида.

Выделяют организованный осадок, включающий эритроциты, лейкоциты, клетки эпителия, цилиндры и «неорганизованный» осадок, представленный кристаллическими образованиями (мочевая кислота, ураты, кислый мочекислый аммоний, кальция фосфат, гиппуровая кислота, магния-аммония фосфат, кальция карбонат, кальция оксалат, цистин, ксантин и др.).

Эритроциты. Неизмененные эритроциты имеют вид дисков зеленовато-желтого цвета, измененные, свободные от гемоглобина, — бесцветные, в виде одноконтурных или двухконтурных колец (рис. 4, *2—4*). В моче низкой относительной плотности встречаются бесцветные эритроциты, высокой плотности — сморщенные. В моче здоровых животных встречаются единичные эритроциты (0—2 в поле зрения). Появление большего количества их называют *гематурией*. Она может быть обусловлена выходом эритроцитов из почек — гематурия гломерулярного происхождения и из мочевыводящих путей при мочекаменной болезни, злокачественных опухолях в мочевом пузыре. При гломерулярной гематурии в моче часто содержится большое количество белка, при негломерулярной — его концентрация незначительна.

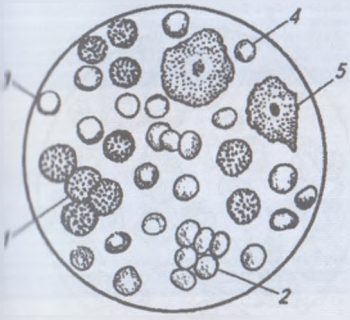


Рис. 4. Микроскопическая картина осадка мочи:
1 — лейкоциты; *2* — эритроциты неизмененные; *3* — эритроциты малоизмененные; *4* — эритроциты измененные (выщелоченные); *5* — клетка плоского эпителия

Лейкоциты. В моче щелочной реакции лейкоциты быстро разрушаются. В моче здоровых животных кислой реакции их количество от 0 до 2 в поле зрения. Лейкоциты имеют вид небольших зернистых клеток округлой формы (см. рис. 4, *I*). Увеличение количества лейкоцитов в моче называют *лейкоцитурией.* Лейкоциты могут попадать в мочу из почек (пиелонефрит), мочевыводящих путей (цистит, уроцистит) или из всей мочевыводящей системы. Когда отмечают лейкоцитурию и выраженную протеинурию, говорят о ее почечном происхождении. Наибольшее количество лейкоцитов (50—100 и более в поле зрения микроскопа) отмечают при пиелонефрите, цистите. Однако степень лейкоцитурии при хроническом пиелонефрите не всегда соответствует тяжести поражения. При затухании процесса, отсутствии выраженного воспаления количество лейкоцитов в моче может оставаться в пределах нормы. Следует иметь в виду, что лейкоциты в мочу могут попадать из половых органов (вагинит, эндометрит, простатит и др.).

Лейкоцитурию помимо микроскопии можно выявить **экспресс-методом (метод Gadeholt).** Принцип. При проведении пероксидазной реакции цитоплазма лейкоцита приобретает голубую или синюю окраску.

Реактивы: краситель — 300 мг диаминофлуорона и 130 мг флюксина В растворяют в 70 мл 96%-ного этилового спирта. К этой смеси добавляют 11 г натрия ацетата ($NaCH_3COO \cdot 3H_2O$), растворенного в 20 мл 0,5%-ной уксусной кислоты, и 1 мл 3%-ного пероксида водорода. Через 48 ч реактив фильтруют, хранят в темной посуде, периодически фильтруют.

Ход определения. 10 мл свежеполученной мочи фильтруют через фильтровальную бумагу, после чего на бумагу наносят 3 капли красителя. При содержании в 1 мкл мочи более 10 лейкоцитов на месте нанесения краски появляется темно-синее пятно. Проба считается отрицательной, если пятно красного цвета, и сомнительной, если пятно голубого цвета. Этот метод выявляет скрытую лейкоцитурию.

Эпителиальные клетки. В осадке мочи можно встретить клетки плоского, переходного и почечного эпителия (рис. 5). Клетки плоского эпителия округлой или полигональной формы, больших размеров, бесцветные с небольшими ядрами. Они попадают в мочу из наружных половых органов и мочеиспускательного канала. Клетки переходного эпителия выстилают слизистую обо-

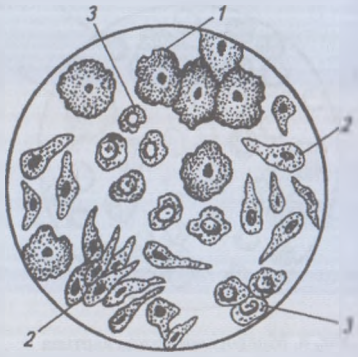


Рис. 5. Клетки эпителия в осадке мочи: *1* — клетки плоского эпителия; *2* — клетки переходного эпителия; *3* — клетки почечного эпителия

лочку мочевыводящих путей и их большое количество в моче говорит о воспалительном процессе в лоханке и мочевом пузыре. Эти клетки имеют различную форму и величину, круглое ядро. По величине они меньше клеток плоского эпителия.

Клетки почечного эпителия имеют вид клеток округлой или многоугольной формы, мелкие (немного больше лейкоцитов), с крупным ядром и крупной зернистостью. Наличие клеток почечного эпителия в моче — характерный признак гломерулонефрита, амилоидоза почек, лихорадочных состояний, интоксикаций.

Цилиндры. Это белковые или клеточные образования канальцевого происхождения, имеющие цилиндрическую форму и различную величину (рис. 6). В мочевом осадке встречаются гиалиновые цилиндры, имеющие нежные контуры и гладкую поверхность. Их обнаруживают при остром и хроническом нефрите, амилоидозе почек, физиологической протеинурии, дегидратации.

Зернистые цилиндры более резких контуров и состоят из плотной зернистой массы желтоватого цвета. Они возникают из распавшихся клеток эпителия канальцев почек и свидетельствуют о дистрофических процессах в канальцах.

Восковые цилиндры имеют резкие контуры и гомогенную структуру желтого цвета. Характерны для хронических заболеваний почек.

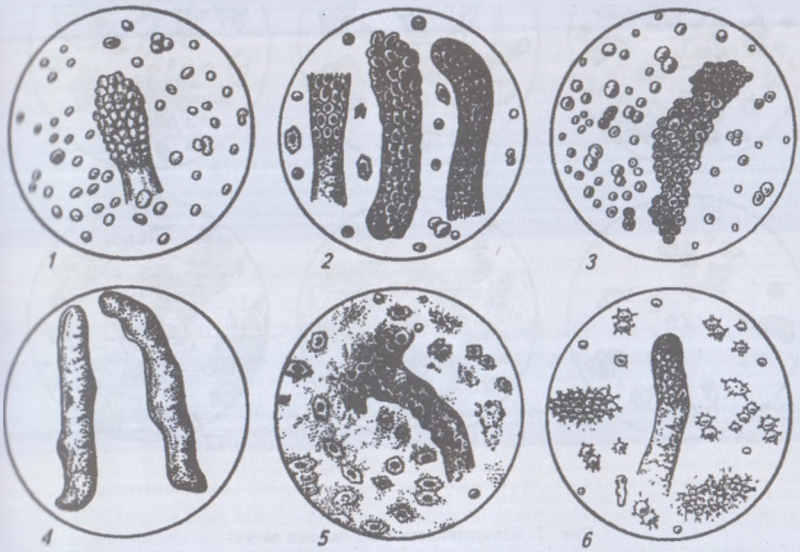


Рис. 6. Мочевые цилиндры:
1 — смешанные (гиалиновый и кровяной); *2* — эпителиальные; *3* — кровяной (эритроцитарный); *4* — зернистые; *5* — зернистый и эпителиальный; *6* — жировой

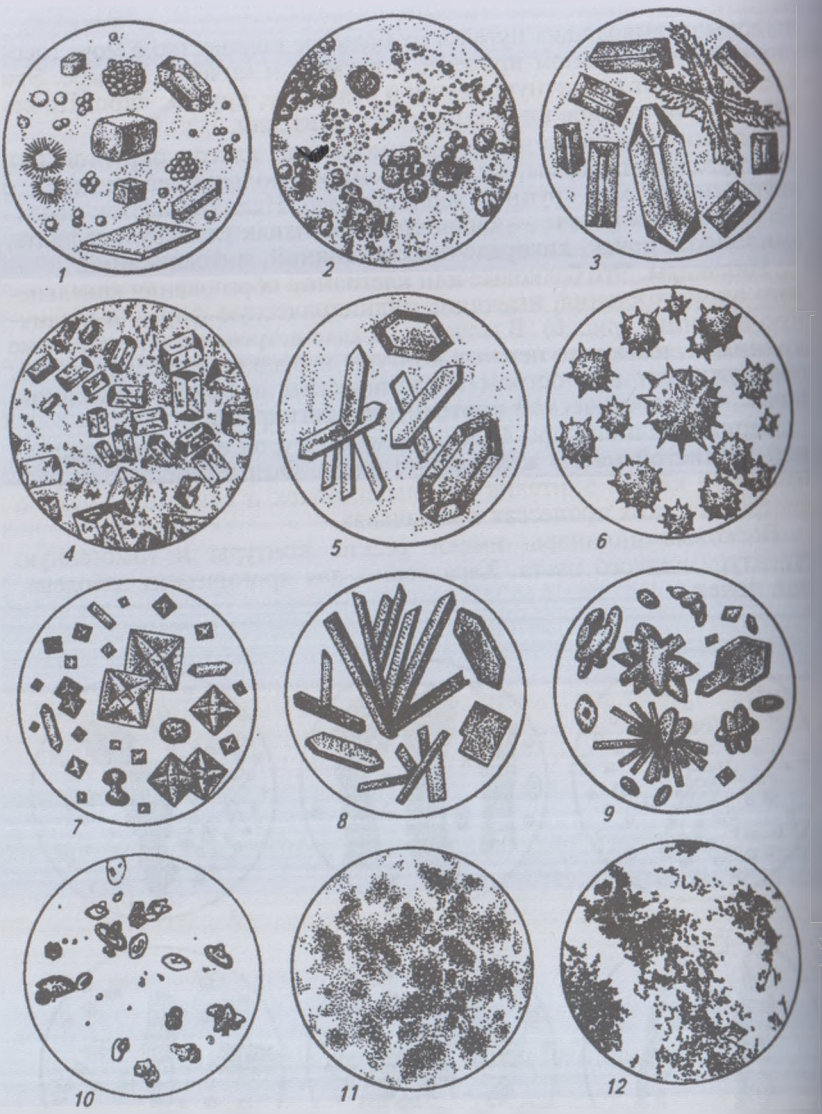


Рис. 7. Неорганизованные осадки мочи:
1, 2 — кальция карбонат; *3, 4* — триппельфосфат (*3* — большое и *4* — малое увеличение), *5* — гиппуровая кислота; *6* — аммония урат; *7* — кальция оксалат; *8* — кальция сульфат, *9, 10* — кристаллы мочевой кислоты; *11, 12* — ураты

В моче могут встречаться эритроцитарные, эпителиальные, гемоглобиновые, лейкоцитарные цилиндры, которые не имеют особого клинического значения.

Неорганизованные осадки — соли, выпавшие в осадок в виде кристаллов или аморфных масс (рис. 7). Характер солей зависит от pH мочи, коллоидного состояния и других ее свойств. В кислой моче обнаруживают мочевую кислоту, ураты, оксалаты, гиппуровую кислоту, кальция сульфат. Мочевая кислота представляет собой полиморфные кристаллы, окрашенные в желтый цвет, легко растворимые в щелочах, но не растворимые в кислотах. Появляется в осадке при высокой концентрации мочи, подагре, лейкозе.

Ураты — соли мочевой кислоты, мелкие зернышки, расположенные в виде кучек, полос. Откладываются на цилиндрах и клетках эпителия. Растворяются при подогревании и прибавлении щелочи. Встречаются при лихорадке, поносе, усиленном потоотделении, лейкозе.

Оксалаты — соли щавелевой кислоты (щавелевокислая известь) — бесцветные кристаллы в виде конвертов, четырехгранных призм. Появляются при скармливании скоту травы с заболоченных лугов или других угодий с кислыми почвами.

В щелочной моче встречаются кристаллы кальция карбоната ($CaCO_3$) в виде бесцветных шаров с концентрической исчерченностью. Чаще лежат парно (розетки, гири, скрещенные барабанные палочки). Растворяются при добавлении кислоты с выделением пузырьков углекислоты.

Аморфные фосфаты (кальция фосфат, магния фосфат) — неокрашенные мелкие образования в виде шариков, лежащих разрозненно или скоплениями.

При щелочной реакции мочи образуются, кроме того, кристаллы магния-аммония фосфата. Неорганизованные осадки мочи особого диагностического значения не имеют.

Источники: 28, 29, 30.

4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛА

Макроскопически определяют консистенцию, цвет, запах кала, остатки непереваренного корма, наличие слизи, прожилок крови, гноя, гельминтов.

Микроскопически выявляют яйца и личинки гельминтов, простейших паразитов, используя соответствующие методы гельминтоскопии, гельминтоовоскопии и др.

Определение pH. Обычно используют лакмусовую бумагу, которая изменяет свой цвет после контакта с фекальными массами в зависимости от концентрации в них ионов водорода (H^+-ионов). Универсальная лакмусовая бумага служит для измерения pH в диапазоне от 1,0 до 10,0. Лакмусовую бумагу смачивают дистиллированной водой, прикладывают к поверхности фекалий и отмечают

изменение цвета, сравнивая с контрольной шкалой. Наиболее точное определение pH кала проводят на pH-метре.

У здоровых животных реакция кала слабощелочная или нейтральная. Она зависит от состояния кишечника, степени бродильных или гнилостных процессов. При нарушении пищеварения в передних отделах пищеварительного тракта, плохом переваривании углеводов они подвергаются воздействию ферментов бродильной микрофлоры кишечника с образованием органических кислот и углекислоты. pH кала сдвигается в кислую сторону, характеризуя бродильную диспепсию.

При застое содержимого в толстом кишечнике, активизации гнилостной микрофлоры реакция кала становится резко щелочной (гнилостная диспепсия).

Обнаружение крови. Принцип. Пигменты крови расщепляют пероксид водорода с освобождением атомарного кислорода, который окисляет вещества (бензидин, амидопирин, гвояколовую смолу), принимающие различную окраску.

Бензидиновая проба. Реактивы: 1%-ный раствор бензидина ($NH_2C_6H_4C_6H_4NH_2$) в 50%-ной уксусной кислоте. Хранят в посуде из темного стекла в течение нескольких дней;

3%-ный раствор пероксида водорода (H_2O_2).

Ход определения. Кал тонким слоем наносят на предметное стекло. Мазок помещают в чашку Петри, лежащую на белой бумаге, и наносят на него по 2—3 капли раствора бензидина и пероксида водорода. При наличии в кале крови сразу же появляется зеленое или синее окрашивание. Если окраска не развивается или появляется позже 2 мин, то проба считается отрицательной. Проба очень чувствительна.

Гвояколовая проба. Реактивы: 2%-ная спиртовая настойка гвояколовой смолы;

ледяная уксусная кислота;

3%-ный раствор пероксида водорода.

Ход определения. Предметное стекло помещают в чашку Петри, покрывают фильтровальной бумагой, на которую наносят кал в виде мазка. На кал капают 2—3 капли ледяной уксусной кислоты, настойки гвояколовой смолы и пероксида водорода.

В присутствии крови появляется сине-зеленое или фиолетовое окрашивание.

Пирамидоновая проба. Реактивы: 5%-ный спиртовой раствор амидопирина (пирамидон);

30%-ный раствор уксусной кислоты;

3%-ный раствор пероксида водорода.

Ход определения. Кусочек кала растирают с 4—5 мл воды и фильтруют. К фильтрату добавляют равный объем раствора амидопирина и 10—12 капель раствора уксусной кислоты и пероксида водорода. При наличии в кале крови в течение 2 мин появляется

сине-фиолетовое окрашивание. Если через 2 мин окраска не развилась, то проба считается отрицательной.

Экспресс-тесты. Некоторые фирмы выпускают бумажные тесты для определения скрытой крови в фекалиях, которые основаны на пробе с гвояковой смолой.

Клиническое значение. Кровь в кале обнаруживают при язвенной болезни, язвенно-эрозивном гастрите, гемостатическом илиусе (тромбоэмболические колики), эймериозе и некоторых других болезнях.

Обнаружение стеркобилина (пробы Шлезингера). Комочек кала растирают приблизительно с 10-кратным объемом дистиллированной воды, приливают равное количество реактива Шлезингера (10 г цинка ацетата, растворенного в 90 мл 96%-ного этилового спирта) и несколько капель раствора Люголя (йода 1 часть, калия йода 2, воды 17 частей), фильтруют. Фильтрат дает зеленую флуоресценцию, которая лучше видна на черном фоне. Образцы кала защищают от действия света.

Клиническое значение. При заболеваниях печени, механическом препятствии оттоку желчи в кишечник отмечают снижение или полное отсутствие стеркобилина в кале. Усиленное желчеотделение или повышенный распад эритроцитов ведет к увеличению стеркобилина в кале. В первом случае реакция отрицательная, во втором — положительная.

Имеются пробы, позволяющие обнаружить и определить стеркобилиноген, аммиак, растворимую слизь в кале, клетки кишечного эпителия, злокачественных опухолей, нейтрального жира, растительной клетчатки, крахмала, соединительной ткани, мышечных волокон (см. Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В. В. Меньшикова. Том III. — М.: Лабпросс, 2000. — 384 с.).

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова (ООО «Борис-99», Москва, Малая Пироговская, 1) производит и реализует наборы реактивов для комплексного химико-микроскопического исследования крови, мочи, кала, мокроты, желудочного сока и спинномозговой жидкости. Набор для общего анализа кала позволяет определять скрытую кровь, стеркобилин, билирубин, степень гидролиза крахмала, наличие мышечных и эластических волокон, цист простейших, жирных кислот и др.

4.4. ИССЛЕДОВАНИЕ МОКРОТЫ

Мокрота — патологическое отделение органов дыхания, выбрасываемое при кашле. В состав ее могут входить слизь, экссудат, клетки крови, элементы распада тканей, микроорганизмы, яйца гельминтов, мицелий грибов и др.

Мокроту извлекают из трахеи с помощью специальных носотрахсальных зондов (Габрилавичуса, Корикова и др.) или из горта-

ни после рефлекторно вызванного кашля. У лошадей образец мокроты берут через резиновую трубку, введенную в трахею.

Физические свойства. Слизистая мокрота слегка беловатая, вязкая, характерна для острого бронхита; серозная — жидкая, бесцветная, пенистая, наблюдается при гиперемии и отеке легких; слизисто-гнойная — желтого или зеленоватого цвета, вязкая, образуется при хронической бронхопневмонии; серозно-фибринозная — характерна для крупозной пневмонии; гнойная — появляется при гнойно-катаральной пневмонии, прорыве абсцесса, зеленовато-желтого оттенка. Красный цвет мокроты обусловлен наличием в ней крови.

Запах у мокроты чаще отсутствует. Зловонный запах появляется при гангрене, абсцессе легких, аспирационной бронхопневмонии. В мокроте можно обнаружить кусочки омертвевшей легочной ткани при гангрене легких, частицы опухолей, сгустки фибрина, которые присутствуют при дифтерийном ларингите, крупозной пневмонии.

Микроскопия. Микроскопическое исследование мокроты проводят в нативных и окрашенных препаратах. Материал для исследования выбирают из разных мест и переносят металлической иглой на предметное стекло, покрывают покровным стеклом так, чтобы мокрота не вытекала за его края. Препарат должен быть тонким, элементы в нем должны располагаться однослойно. Просмотр вначале проводят под малым увеличением (объектив × 8, окуляр × 10), при котором обнаруживают скопление клеток, нити эластических волокон, элементы новообразований, затем под большим увеличением (объектив × 40, окуляр × 10).

Исследование под большим увеличением позволяет обнаружить в значительном количестве лейкоциты (воспалительные, нагноительные процессы), эритроциты в виде желтоватых дисков (легочное кровотечение, застой в малом круге кровообращения), микроорганизмы.

Цилиндрический мерцательный эпителий в небольшом количестве присутствует в каждом образце мокроты, в большом — при трахеите, бронхите, бронхопневмонии.

В эпителиальных клетках специальными методами исследования находят вирусные тельца-включения — хламидии (хламидиозная бронхопневмония) или микоплазмы (микоплазменная пневмония).

Альвеолярные макрофаги — крупные клетки, в 2—3 раза больше лейкоцитов, в большом количестве появляются в мокроте при воспалении бронхов и легких, застое крови в малом круге кровообращения, пороках сердца. Цитоплазма их содержит различные включения: бесцветные (миелиновые) зерна, желто-коричневые от гемосидерина и др.

Макрофаги можно выявить реакцией образования берлинской лазури. Кусочек мокроты помещают на предметное стекло, прибавляют 1—2 капли 2%-ного раствора кислоты хлористоводород-

ной и 1—2 капли 5%-ного раствора желтой кровяной соли. Перемешивают стеклянной палочкой и покрывают покровным стеклом. Излишек реактива удаляют фильтровальной бумагой. Через несколько минут зерна гемосидерина, находящиеся в макрофагах, окрашиваются в синий или сине-зеленый цвет.

В мокроте при распаде легочной ткани обнаруживают эластические волокна. Они имеют вид тонких двухконтурных изогнутых волоконец. Их обнаруживают не в каждой капле мокроты, поэтому прибегают к концентрации:

метод 1: к нескольким миллилитрам мокроты прибавляют такое же количество 10%-ного раствора натрия гидроксида и нагревают до растворения слизи. При этом растворяются слизь, форменные элементы крови, но остаются эластические волокна. Затем к жидкости добавляют 3—5 капель 1%-ного спиртового раствора эозина, центрифугируют, а осадок исследуют под микроскопом. Эластические волокна сохраняют свою структуру и выделяются ярко-красным цветом. Однако посторонние волокна и нити тоже могут окраситься эозином и мешать распознаванию эластических волокон;

метод 2: наиболее специфической пробой является окраска эластических волокон резорцин-фуксином Вейгерта. Готовят раствор красителя: 0,5 г основного фуксина и 1 г резорцина растворяют в 50 мл дистиллированной воды, нагревают до кипения и постепенно приливают раствор из 2 г железа хлорида в 10 мл воды. Смесь кипятят 5 мин, осторожно встряхивая, после охлаждения фильтруют. Фильтр с осадком переносят в колбу, заливают 70 мл 96%-ного этилового спирта и осторожно нагревают. Осадок краски при этом должен раствориться. После удаления фильтра к охлажденному раствору добавляют 1 мл 25%-ной кислоты хлористоводородной. Хранят краситель несколько месяцев.

Ход определения. Препарат мокроты фиксируют в 96%-ном этиловом спирте в течение 2 мин, сливают спирт, помещают в бюксу с раствором красителя. После окраски препарат ополаскивают водой и выдерживают 2 мин в 96%-ном этиловом спирте, высушивают и микроскопируют под малым увеличением. Эластические волокна окрашиваются в красно-фиолетовый цвет; видны древовидные, ветвящиеся волокна, их обрывки.

В нативных неокрашенных препаратах мокроты можно обнаружить мицелии, характерные для грибов различных видов, поселяющихся в органах дыхания (кандидоз, аспергиллез и др.), а также актиномицеты. Грибы из рода Кандида развиваются в органах дыхания при длительном лечении животных антибиотиками. При поражении легких грибами из рода Кандида в нативном препарате обнаруживают почкующиеся дрожжеподобные клетки и ветвистый мицелий, на котором споры расположены мутовками. Друзы актиномицетов макроскопически имеют вид мелких желтоватых зернышек, содержащихся в гнойной части мокроты. Микроскопичес-

ки они представляют собой сплетения тонкого мицелия, концы которого заканчиваются колбообразными вздутиями. При окраске препарата по Граму нити мицелия грамположительны, колбообразные вздутия — грамотрицательны.

Окраска по Граму. Готовят реактивы: карболовый раствор генцианового фиолетового: 1 г генцианового фиолетового растворяют в 10 мл 96%-ного этилового спирта, раствор выливают в 100 мл 1—2%-ного раствора карболовой кислоты, взбалтывают; раствор Люголя — 1 г йода, 2 г калия йодида и 300 мл дистиллированной воды; йод и калия йодид растворяют сначала в 5—8 мл воды, а затем приливают оставшуюся воду; 96%-ный этиловый спирт; 10%-ный раствор карболового фуксина: 10 г карболового фуксина и 90 мл дистиллированной воды.

На фиксированный препарат кладут полоску фильтровальной бумаги и смачивают ее раствором генцианового фиолетового. Красят 1,5—2 мин. Бумагу сбрасывают и заливают раствором Люголя на 2 мин, препарат прополаскивают в спирту до серого цвета. Промывают водой и окрашивают 10%-ным раствором карболового фуксина 10—15 с. После этого препарат опять промывают водой, высушивают и исследуют под микроскопом.

При окрашивании раздавленной друзы актиномицетов мицелий приобретает фиолетовую, а колбочки розовую окраску. Актиномицеты обнаруживают в мокроте при актиномикозе легких.

Бактериоскопия окрашенных препаратов. Для бактериоскопического исследования мазки готовят, растирая комочек мокроты между двумя предметными стеклами. Высушенный мазок фиксируют, медленно проводя его 3 раза через слабое пламя газовой горелки, и окрашивают чаще по Граму. В окрашенных по Граму препаратах обнаруживают грамположительные пневмококки, стрептококки, грамотрицательные диплобациллы, E. coli и др. Грамположительная и грамотрицательная микрофлора — постоянный обитатель респираторных органов, она становится патогенной при определенных условиях. При воспалительных процессах в бронхах и легких ее количество резко возрастает. Специальными бактериологическими методами определяют вирулентность микрофлоры мокроты, ее устойчивость к антимикробным препаратам.

Источники: 28, 31.

4.5. ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИКВОРА

Ликвор (спинномозговая жидкость) секретируется сосудистыми сплетениями центральной нервной системы и циркулирует в специальных резервуарах или цистернах в области основания мозга, омывая извилины головного мозга, выпуклую поверхность мозга, центральный канал и подпаутиновое пространство спинного мозга. Образование ликвора происходит в боковых желудочках мозга,

а также в субарахноидальных пространствах. Вода и электролиты быстро проникают в цереброспинальную жидкость и также быстро уходят из нее. Ликвор выполняет функцию «подушки» для мозга, предотвращая или уменьшая его смещение. Метаболическая роль его не выяснена. Поэтому исследование ликвора проводят в основном в целях диагностики воспалительных заболеваний ЦНС.

Получают ликвор люмбальной, субокципитальной и постокципитальной пункциями, которые проводят специальными иглами с мандреном. Для лабораторных исследований берут 5—15 мл ликвора; для подсчета клеток достаточно 0,5 мл. В ликвор, содержащий фибриноген, что бывает при менингите, добавляют антикоагулянт (ЭДТА). Операцию по получению ликвора проводят под наркозом с соблюдением правил асептики и антисептики.

Люмбальную пункцию проводят в месте между последним поясничным позвонком и передним краем крестцовой кости; у собак — между 5-м и 6-м или 6-м и 7-м позвонками.

Субокципитальную пункцию делают в месте крыловидного отверстия (в затылочной ямке) — между затылочной костью и атлантом (первый шейный позвонок).

Постокципитальную (цервикальную) пункцию делают между атлантом и вторым шейным позвонком (эпистрофеем); у собак — между наружным затылочным выступом и краниовентральной частью остистого отростка эпистрофея.

Физические свойства. Ликвор представляет собой прозрачную жидкость, похожую на воду. Относительная плотность его у здоровых животных 1,004—1,008 кг/л, она повышается при менингите, менингоэнцефалите, энцефаломиелите, злокачественной катаральной горячке, уремии и диабете.

Цвет. У здоровых животных ликвор бесцветный, при пункции первые порции могут содержать кровь и быть окрашены в красный цвет. Ярко-красный цвет ликвора обусловлен наличием в нем крови (эритрохромия) при кровоизлиянии вследствие травмы позвоночника или черепа. Желтый (ксантохромия) и буровато-коричневый цвет придают ликвору продукты распада гемоглобина. Это бывает при застое крови в сосудах мозга, что приводит к поступлению плазмы в ликвор (застойная ксантохромия) или попадания в ликворное пространство крови. Эритрохромия и ксантохромия бывают при травмах, гиперемии и отеке мозга, солнечном ударе, гипертермии, пироплазмозе, нутталиозе, желтухе. Зеленоватую окраску ликвору может придавать биливирдин — продукт распада билирубина.

Прозрачность. В норме спинномозговая жидкость прозрачная. Помутнение ликвора происходит при наличии в нем гноя, большого количества белка, лейкоцитов, микроорганизмов, фибриногена (воспаление головного и спинного мозга и их оболочек).

Биохимические и морфологические исследования. В ликворе можно определить содержание общего белка, глобулинов, глюкозы, электролитов, клеток крови и других показателей.

Определение белка. В качестве унифицированного используют метод с кислотой сульфосалициловой и натрия сульфатом.

Принцип. Кислота сульфосалициловая вызывает коагуляцию белков и помутнение ликвора, степень которого пропорциональна содержанию белков.

Реактивы: 6%-ный раствор кислоты сульфосалициловой;

14%-ный раствор безводного натрия сульфата. Для анализа применяют свежеприготовленный рабочий раствор: смесь равных объемов приведенных выше реактивов;

1%-ный стандартный раствор альбумина. 1 г лиофилизированного альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки) растворяют в небольшом количестве 0,9%-ного раствора натрия хлорида в мерной колбе на 100 мл и доводят объем этим же раствором до метки. Реактив нестойкий, для стабилизации к нему добавляют 1 мл 5%-ного раствора натрия азида ($NaNO_3$). 1 мл раствора содержит 10 мг альбумина. В холодильнике можно хранить до 2 мес.

Ход определения. В пробирку вносят 5 мл свежеприготовленного рабочего раствора и 0,5 мл ликвора, перемешивают. Через 10 мин интенсивность помутнения измеряют на ФЭКе в кювете с длиной оптического пути 1 см против холостой пробы (0,9%-ного раствора натрия хлорида). Длина волны 410—480 нм (сине-фиолетовый светофильтр). Расчет ведут по калибровочному графику.

Для построения калибровочного графика из калибровочного раствора готовят разведения и обрабатывают их как опытную пробу. В 5 пробирок вносят соответственно 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 и 1 мл раствора альбумина и в каждую из них доливают до объема 10 мл 0,9%-ного раствора натрия хлорида. Концентрация белка в этих растворах составляет соответственно 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 и 1 г/л.

Примечания. 1. Если муть начинает оседать, то перед измерением интенсивности пробирку тщательно встряхивают. 2. Перед определением белка рекомендуется поставить качественную пробу Панди, и если результат реакции оценивается 3+ или 4+ (много белка), то ликвор разводят 0,9%-ным раствором натрия хлорида и при расчете учитывают степень разведения. 3. Прямолинейная зависимость калибровочной кривой сохраняется до 1 г/л. При более высокой концентрации белка в ликворе ее разводят 0,9%-ным раствором натрия хлорида.

Клиническое значение. Концентрация общего белка в ликворе повышается при нарушении гемодинамики, воспалительных процессах в головном и спинном мозге и их оболочках. В ликворе, также как в сыворотке крови, общий белок представлен альбуминами и глобулинами.

Определение глобулинов по реакции Панди. Принцип. Реакция основана на осаждении глобулинов насыщенным раствором карболовой кислоты.

Реактив: насыщенный раствор карболовой кислоты. 100 г карболовой кислоты растворяют в 1 л воды, встряхивают и помещают в термостате при 37 °С на 6—8 ч. Затем оставляют стоять 7 дней при комнатной температуре, надосадочную жидкость сливают и используют в качестве реактива.

Ход определения. На часовое стекло, помещенное на черную бумагу, наносят 1 мл реактива и по краю наслаивают 1—2 капли ликвора. В случае положительного результата в месте соприкосновения реактива с ликвором образуется молочно-белое облачко, переходящее в муть.

Результаты реакции Панди обозначают четырьмя плюсами: слабая опалесценция 1+, заметная опалесценция 2+, умеренное помутнение 3+, значительное помутнение 4+.

Микроскопия. Микроскопию ликвора проводят в целях определения количества лейкоцитов, эритроцитов, дифференцировки клеточных элементов. Подсчет клеток в камере проводят в течение 1 ч после получения ликвора.

Подсчет лейкоцитов. Принцип. Количество лейкоцитов подсчитывают в счетной камере после разрушения эритроцитов раствором уксусной кислоты.

Реактивы: 10%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенной метиленовым фиолетовым: ледяной уксусной кислоты 5 мл, воды до 50 мл, метиленового фиолетового 0,1 мл.

Оборудование: микроскоп с осветителем; камера Фукса—Розенталя или с сеткой Горяева; смесители для подсчета лейкоцитов (меланжеры).

Ход определения. В меланжер набирают до метки I 10%-ный раствор уксусной кислоты, подкрашенный метиленовым фиолетовым; затем до метки II набирают ликвор. После встряхивания заполняют камеру Фукса—Розентеля содержимым меланжера, предварительно выпустив первую каплю. Камера Фукса—Розентеля состоит из 16 больших квадратов, каждый из которых разделен на 16 малых — всего 256 квадратов. Глубина камеры 0,2 мм, общий объем 3,2 мкл.

Лейкоциты считают во всех 256 квадратах и полученное число делят на 3,2 (объем камеры). Результат соответствует количеству форменных элементов в 1 мкл ликвора; кроме того, полученный результат делят на 10/11 (степень разведения ликвора). Таким образом, формула для пересчета выглядит так:

$$\frac{A \cdot 11}{3{,}2 \cdot 10} = \frac{A}{3},$$

где A — число форменных элементов в объеме 256 квадратов.

Для дифференциации лейкоцитов ликвор вначале центрифугируют, затем из осадка делают мазок, фиксируют и окрашивают.

Окраска по Розиной. Спинномозговую жидкость центрифугируют 7—10 мин. Надосадок сливают, осадок помещают на обезжиренное стекло, легким покачиванием распределяют его по поверхности стекла, через 1—2 мин стекло ставят в вертикальное положение, жидкость стекает. В зависимости от предполагаемого количества лейкоцитов осадок располагают на стекле на участке от 1 до 3 $см^2$ и более. При очень большом количестве клеточных элементов и наличии крови осадок распределяют по всей поверхности предметного стекла и тотчас сливают. При этом достигается минимальная толщина мазка.

Мазки высушивают в сушильном шкафу при температуре 40—50 °С. Затем фиксируют метанолом 1—2 мин и красят по Романовскому: тонкий препарат с небольшим цитозом 6—7 мин, с большим цитозом и кровью 10—12 мин. Затем краску сливают, мазок промывают дистиллированной водой и высушивают. Если ядра имеют бледно-голубой цвет, мазок докрашивают еще 2—3 мин. Готовый мазок просматривают под микроскопом.

Кроме лейкоцитов в ликворе обнаруживают плазматические клетки, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, опухолевые клетки и др.

Клиническое значение. Количество лейкоцитов в спинномозговой жидкости здоровых животных не превышает 5—8 в 1 мкл. На лимфоциты приходится 60—80 %, на моноциты 20—40 %. Увеличение количества лейкоцитов (плеоцитоз) встречается при менингите, энцефалите, миелите, менингоэнцефалите различной этиологии. Резко повышается их содержание при опухолях ЦНС, хронических воспалительных процессах в оболочках мозга, а также в послеоперационном периоде.

Источники: 28, 31.

Для общего клинического анализа спинномозговой жидкости (определение белка с сульфасалициловой кислотой, глобулинов в реакции Панди, цитоза с реактивом Самсона) ООО «Борис-99» (Москва) производит и реализует набор реактивов.

ГЛАВА 5

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРЕННИХ БОЛЕЗНЕЙ

Для оценки морфофункционального состояния отдельных органов и систем, диагностики многих болезней используют сотни различных лабораторно-клинических показателей (тестов). Глубина познания физиологических и патологических процессов, диагностическая значимость и надежность исследований зависят от правильности подбора лабораторно-клинических показателей. Учитывая ограниченную возможность ветеринарных лабораторий и отдельных исследователей, необходимо осмысленно подбирать наиболее информативные показатели при исследовании биологического материала. Известно, что многие патологические процессы и болезни сопровождаются определенными, характерными изменениями показателей крови, мочи, рубцового содержимого и др. Например, для сахарного диабета наряду с изменениями показателей белкового, жирового, минерального обменов характерно, как правило, значительное повышение содержания сахара в крови, появление его в моче. Кетоз сопровождается высоким количеством кетоновых тел в крови, моче, молоке, рубцовом содержимом. При болезнях печени происходят известные изменения показателей общего белка сыворотки крови, его фракций, билирубина, активности ферментов. При ацидозе рубца снижается pH его содержимого, при пастбищной тетании уменьшается в крови концентрация магния, при нефрите повышается уровень мочевины в крови, при бронхопневмонии характерно изменяется бронхолегочный тест.

5.1. БОЛЕЗНИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Кетоз. Преимущественно хроническая болезнь крупного рогатого скота и овец, буйволиц, характеризующаяся накоплением в организме кетоновых тел (β-оксимасляная, ацетоуксусная кислоты и ацетон) и сопровождающаяся вследствие этого дистрофическими процессами в печени, сердце, почках, гипофиз-надпочечниковой системе, щитовидной, околощитовидных желез и других органах.

При кетозе нарушается рубцовое пищеварение и в кровь поступает избыточное количество масляной кислоты, аммиака, кетогенных аминокислот при недостаточном притоке глюкозы и других глюкопластических средств. Неадекватный приток глюкопласти-

ческих средств и их расход ведут к усиленному липолизу, образованию большого количества свободных жирных кислот (НЭЖК). Создаются условия торможения реакций цикла трикарбоновых кислот, задерживается окисление ацетил-КоА, происходит ресинтез из него ацетоацетил-КоА, ацетоуксусной, β-оксимасляной кислот и ацетона. Происходит накопление в организме кетоновых тел, которые, в свою очередь, вызывают нарушение функций гипофиз-надпочечниковой системы, щитовидной, околощитовидных желез, сердца и других органов. Поражение печени сопровождается нарушением ее белково- и мочевинообразующей функции, в крови увеличивается содержание грубодисперсного белка, аммиака, снижается концентрация мочевины, повышается активность аминотрансфераз. Поражение эндокринных органов, в частности гипофункция щитовидной и околощитовидных желез, ведет к развитию вторичной остеодистрофии.

Диагностические тесты: при остром кетозе — повышение содержания в крови, моче, молоке, рубцовой жидкости кетоновых тел, снижение в крови глюкозы, резервной щелочности.

У здоровых новотельных коров, по нашим данным (И. П. Кондрахин), в крови содержится кетоновых тел до 8 мг/100 мл, в молоке — 6—8, в моче — 9—10 мг/100 мл. У больных животных в острую стадию болезни количество кетоновых тел в крови достигает 20 мг%, в моче — 100—500, в молоке — 20—25 мг% и выше.

Содержание глюкозы в крови больных коров снижается до 35—25 мг% (1,9—1,4 ммоль/л), у здоровых животных концентрация глюкозы в крови составляет 40—60 мг% (2,2—3,3 ммоль/л). Резервная щелочность в крови снижается до 37 об.% CO_2 (в норме у коров 46—66 об.% CO_2).

При хроническом кетозе содержание в крови гемоглобина ниже 80—90 г/л, общего кальция — ниже 9,5 мг%.

При хроническом кетозе наблюдаются снижение в крови количества гемоглобина (ниже 80—90 г/л), общего кальция (ниже 9,5 мг%, 2,4 ммоль/л), повышение преимущественно общего белка сыворотки крови (выше 80—86 г/л), неорганического фосфора (выше 6 мг%, 1,94 ммоль/л). При затяжном течении болезни и развитии признаков вторичной остеодистрофии содержание кетоновых тел в крови, моче и молоке находится на верхних пределах нормы или немного превышает ее.

Кетоз суягных овцематок. Тяжелое заболевание, характеризующееся усиленным распадом эндогенных жиров и белков, развитием токсемии, дистрофии печени и других органов. При недостаточном поступлении с кормом углеводов, белков и жиров наступает усиленный распад этих веществ в организме. Промежуточными продуктами распада депонированных жиров являются свободные жирные кислоты, из которых при недостатке глюкозы и торможении реакций в цикле трикарбоновых кислот образуются кетоновые тела.

Диагностические тесты: повышение в крови, моче содержания кетоновых тел, снижение сахара. Концентрация кетоновых тел в крови возрастает до 15 мг/100 мл и более, в моче — до 100—800 мг/100 мл. Содержание сахара снижается до 35 мг/100 мл (1,94 ммоль/л) и ниже.

Вторичная остеодистрофия коров. Хроническая болезнь, характеризующаяся системной костной дистрофией, нарушением обмена веществ, функций щитовидной и околощитовидной желез, печени и других органов вследствие кетоза.

В основе патогенеза этой болезни лежит нарушение функции щитовидной и околощитовидной желез вследствие затяжного течения кетоза.

Диагностические тесты: снижение содержания гемоглобина в крови (ниже 90 г/л), резервной щелочности (менее 46 об.% CO_2), кальция сыворотки крови (менее 9,5 мг/100 мл, 2,4 ммоль/л). Общего белка в сыворотке крови чаще более 86 г/л, фосфора 6 мг/100 мл (1,95 ммоль/л). Белково-осадочные пробы положительные.

Миоглобинурия. Тяжелое остропротекающее заболевание, сопровождающееся накоплением в мышцах молочной и других кислот, своеобразным их изменением, парезом задней части тела, выделением с мочой миоглобина. Возникновению заболевания предшествует избыточное накопление в мышцах гликогена, при распаде которого образуется большое количество молочной кислоты, под действием которой набухают и уплотняются мышечные волокна, возникает контрактура мышц с последующим перерождением и распадом мышечных волокон, высвобождением миоглобина.

Миоглобин — хромопротеид мышц, мышечный гемоглобин, дыхательный пигмент, обеспечивающий в мышцах кратковременный запас кислорода, поступает в кровь, а поскольку почечный порог у него низкий, выделяется с мочой. Продукты распада белков мышц вызывают токсемию, сдвиг кислотно-щелочного равновесия в сторону ацидоза, протеинурию и другие патологические изменения.

Диагностические тесты: в моче pH ниже 6,5—7,0, наличие миоглобина и нередко белка. В крови выражено снижение резервной щелочности до 35 об.% CO_2 и ниже, повышение содержания глюкозы до 166 мг/100 мл (9,2 ммоль/л), молочной кислоты до 23 мг/100 мл (1,36 ммоль/л), несколько уменьшена концентрация магния. СОЭ при тяжелом течении болезни резко замедлена, а в случае развития сепсиса — ускорена, при средней тяжести вначале замедлена, а затем приближается к норме, при легком течении заболевания в пределах нормы. Величина гемокрита при тяжелом течении болезни понижается до 27—25 %. Сыворотка крови розово-красного цвета, при выздоровлении соломенно-желтого. Содержание общего белка сыворотки крови нередко повышено вследс-

твие поражения печени, осадочная белковая проба положительная. Содержание молочной кислоты резко возрастает.

Гипогликемия поросят. Заболевание, характеризующееся резким снижением содержания сахара в крови. Сущность болезни заключается в неадекватном притоке и потреблении энергетических веществ, в частности глюкозы, в первые дни жизни поросят. При недостаточном поступлении углеводов с молоком усиленно расходуется гликоген и глюкоза организма, вследствие чего снижается ее уровень в крови. В этих условиях повышается процесс образования глюкозы из жиров и белков (неоглюкогенез). Но так как запасы жира у поросят малы, то неоглюкогенез в основном идет за счет распада белковых компонентов — аминокислот, вследствие чего в крови повышается содержание остаточного азота.

Диагностические тесты: понижение уровня глюкозы до 40 мг% (2,2 ммоль/л) и ниже при норме 95—105 мг% (5,27—6,03 ммоль/л), повышение концентрации мочевины в сыворотке крови до 100—150 мг% (16,6—24,9 ммоль/л) при норме 40—50 мг% (6,7—8,3 ммоль/л). Снижение количества гемоглобина в крови.

Мочекислый диатез. Заболевание, характеризующееся повышенным образованием мочевой кислоты и отложением ее солей на серозных оболочках грудобрюшной полости, почек, печени, на синовиальных оболочках суставов (подагра). Встречается преимущественно у птиц.

Диагностические тесты: содержание мочевой кислоты в сыворотке крови выше 7—8 мг/100 мл (413—472 мкмоль/л). Наблюдают повышение уровня общего белка, гептоглобина в сыворотке крови, серамукоида, креатинина, общих липидов, снижение резервной щелочности.

Алиментарная остеодистрофия. Хроническая болезнь, сопровождающаяся дистрофическими изменениями в костной ткани в результате недостаточного поступления с кормом кальция, фосфора, магния, энергетических, белковых и других веществ.

При недостаточном притоке энергии, белковых компонентов, минеральных веществ и витаминов нарушаются процессы образования органического вещества кости, синтеза коллагена, мукополисахаридов, обогащения органического матрикса ионами кальция, фосфора и другими элементами, построения кристаллической решетки гидроксиапатита.

В костной ткани содержится около 98,5% всего кальция организма, 83% фосфора, 70% магния и 40% натрия. В ней находится более 50 микро- и ультрамикроэлементов. Недостаток их в кормах длительное время компенсируется за счет костного депо, однако при этом процессы декальцинации и деминерализации кости преобладают над процессами минерализации. Вследствие этого кость обедняется минеральными элементами, происходит ее дистрофия, замещение фиброзной тканью.

Диагностические тесты: значительно снижается содержание гемоглобина, общего белка в сыворотке крови, общего и ионизированного кальция, неорганического фосфора, магния, каротина и витамина А, лимонной кислоты, щелочного резерва, повышается активность фосфатазы. По нашим данным (И. П. Кондрахин), у тяжелобольных коров содержание общего кальция в сыворотке крови колеблется от 6,26 до 11,5 мг/100 мл, неорганического фосфора — от 3,4 до 4,8, магния — от 1,40 до 1,93 мг/100 мл, общего белка — от 50 до 80,6 г/л, активность щелочной фосфатазы — от 7,10 до 25,75 ед. Бодански.

Энзоотическая остеодистрофия. Хроническая болезнь, обусловленная дисбалансом макро- и микроэлементов в почве, воде, кормах. Характеризуется дистрофией костной ткани, замедлением роста у молодняка. Болеют преимущественно крупный рогатый скот и овцы. Болезнь распространена в зонах Южного Урала, Башкирского Приуралья, Восточного Забайкалья, в регионе реки Уров (уровская болезнь).

Диагностические тесты: снижение в крови количества эритроцитов и гемоглобина, связанного с белком йода, кальция, нередко фосфора. В кормах и воде низкое содержание кальция, йода, меди, селена, повышенное — стронция и бария.

Гипомагниемия. Остропротекающая болезнь, характеризующаяся повышенной возбудимостью, клоническими и тетаническими судорогами вследствие резкого снижения магния в крови. Магний активирует холинэстеразу и ускоряет гидролиз ацетилхолина — медиатора нервных импульсов. Возбудимость нервных окончаний при этом тормозится, мышцы расслабляются. При недостатке магния активность холинэстеразы снижается, концентрация ацетилхолина возрастает, повышается нервная возбудимость, появляются клонические и тетанические судороги.

Диагностические тесты: снижение в сыворотке крови магния до 1,7 мг% (0,7 ммоль/л) и ниже (норма 2—3 мг/100 мл), кальция до 8,5—7,5 мг% (2,1—1,9 ммоль/л).

Гипокобальтоз. Эндемическая болезнь, обусловленная недостаточностью в организме кобальта и характеризующаяся нарушением эритропоэза, белкового обмена, костной дистрофией и истощением.

Диагностические тесты: содержание подвижных форм кобальта в пахотном (20-сантиметровом) слое почвы менее 0,4—1,8 мг/кг. В крови отмечается резкое снижение количества гемоглобина и эритроцитов соответственно до 47—30 г/л и 4—2,5 млн/мкл ($4—2{,}5 \cdot 10^{12}$/л). Содержание кобальта в цельной крови ниже 2,5 мкг/100 мл (0,43 мкмоль/л). Цветовой показатель выше 1. Отмечают гипопротеинемию — 70—65 г/л и ниже и гипокальциемию — ниже 10 мг/100 мл (2,5 ммоль/л).

Гипокупроз. Преимущественно хроническое заболевание, сопровождающееся нарушением гемопоэза, изменением цвета волос (обесцвечиванием), дистрофическими изменениями в ЦНС.

Диагностические тесты: в почвах пахотного слоя оптимальное содержание подвижных форм меди составляет не более 2,5—4 мг/кг, недостаточное — менее 0,9—1,4 мг/кг, избыточное — более 4 мг/кг сухой почвы, в кормах недостаточное — менее 6—10 мг/кг, в цельной крови — ниже 70 мкг%. Гипокупроз сопровождается снижением в крови количества гемоглобина и эритроцитов.

Недостаточность цинка. Заболевание, характеризующееся нарушением процессов ороговения клеток эпидермиса (паракератоз), костеобразования, кроветворения, воспроизводительной функции.

Диагностические тесты: почвы содержат менее 3 мг/кг обменного цинка, корма — менее 20 мг/кг сухого вещества, снижение содержания цинка в сыворотке крови ниже 200 мкг/100 мл, а в цельной крови — ниже 300—400 мкг/100 мл. Наблюдается иммунный дефицит. Содержание цинка в сыворотке крови поросят ниже 50 мкг% (7,70 мкмоль/л) — показатель цинковой недостаточности.

Недостаточность марганца. Хроническое заболевание, характеризующееся нарушением воспроизводительной функции, дистрофией костей и суставов (скользящий сустав).

Диагностические тесты: у больных животных содержание марганца в крови ниже 5 мкг/100 мл, а в воде ниже 4 мг/кг. Заболевание встречается в зонах Южного Урала, Башкирского Приуралья и других регионах с песчаными и торфяными почвами нейтральной или слабонейтральной реакции. При высоком показателе pH усвояемость из почвы марганца растениями снижается.

Беломышечная болезнь. Заболевание, сопровождаемое у молодняка дистрофией скелетных и сердечной мышц, печени и других органов.

Диагностические тесты: содержание селена в кормах менее 1 мг/кг сухого вещества корма, в цельной крови — ниже 10 мкг/100 мл, в сырой печени — 3—5 мг/100 г, в волосах — 120 мкг/кг, в молоке — 4 мкг/л. Увеличение в крови концентрации креатина, повышение активности глютатионпероксидазы.

Недостаточность фтора (энзоотический кариес зубов). Хроническое заболевание, проявляющееся прогрессирующим разрушением твердых тканей зубов. Встречается у животных в некоторых регионах Южного Урала, Забайкалья и др.

Диагностические тесты: содержание фтора в воде менее 0,5 мг/л. Среднее пороговое содержание фтора в воде 0,3—0,4 мг/л, в растениях 3—5 мг/кг.

Энзоотический флюороз. Хроническое заболевание, проявляющееся главным образом остеосклерозом и гипоплазией эмали зубов. Встречается в районах Кольского полуострова, Южного Урала, Забайкалья, Якутии, центральных областей России и др.

Диагностические тесты: содержание фтора в питьевой воде более 1,2—1,5 мг/л, в почвах — более 0,05 %.

Гиповитаминоз А. Хроническое заболевание, сопровождающееся усиленной метаплазией и ороговением эпителиальных клеток,

нарушением сумеречного зрения, воспроизводительной функции и роста молодняка.

Диагностические тесты: недостаток в рационах каротина и витамина А. Снижение уровня каротина в сыворотке крови взрослого крупного рогатого скота и молодняка старше 3 мес до 0,4 мг/100 мл и ниже, а ретинола до 16 мкг/100 мл и ниже. У овец болезнь проявляется при содержании ретинола в сыворотке крови менее 20 мкг/100 мл, у свиней менее 10 мкг/100 мл (норма 50 мкг/100 мл и выше). У телят молочного периода клинические признаки гиповитаминоза А проявляются при содержании ретинола в сыворотке крови 48 мкг/100 мл. Молозиво первого удоя от коров с недостаточностью ретинола содержит менее 4 мг/кг витамина А, молоко — следы. Содержание в молозиве овец первого удоя 3—5 мг/кг, а в молоке 3 мг/кг ретинола свидетельствует о хорошем обеспечении маток каротином, а ягнят витамином А. Снижение этих показателей указывает на гиповитаминоз А.

Гиповитаминоз D. Хроническое заболевание, сопровождающееся нарушением фосфорно-кальциевого обмена, дистрофией кости. У молодняка болезнь называется рахитом.

Диагностические тесты: содержание в сыворотке крови общего кальция ниже 9,0 мг/100 мл (2,25 ммоль/л), неорганического фосфора менее 4,5 мг/100 мл (1,45 ммоль/л), активность щелочной фосфатазы выше 5 ед. Бодански или выше 1,4 мкмоль/мл за 1 ч инкубации при 37°С. У молодняка отмечают снижение в крови эритроцитов и гемоглобина. Общий белок сыворотки крови в пределах нормы или ниже ее. Содержание в крови 1,25-дигидроксивитамина D_3 у больных телят снижено и составляет 7—14 нг/мл против 39—70 нг/мл у здоровых (В. И. Левченко, Г. В. Чумак).

Гиповитаминоз Е. Хроническое заболевание, проявляющееся нарушением окислительных процессов в организме и его тканях, перерождением и некрозом печеночных клеток, мышечной дистрофией.

Диагностические тесты: показатели, характерные для дистрофии печени. Снижение в сыворотке крови содержания токоферола до 2 мкмоль/л. У больных поросят этот показатель менее 100 мкг/100 мл (2,32 мкмоль/л), у здоровых — 145—179 мкг/100 мл. У здоровых коров содержание токоферола в сыворотке крови в зимний период 400—500 мкг/100 мл (9,26—11,6 мкмоль/л), в летний — около 800 мкг/100 мл (8,58 мкмоль/л) и более, а у больных значительно ниже. При гиповитаминозе Е отмечается повышение активности АсАТ, АлАТ, альдолазы, ЛДГ.

Гиповитаминоз К. Заболевание, характеризующееся снижением свертываемости крови. Болеют преимущественно птицы и пушные звери.

Диагностические тесты: снижается в крови количество эритроцитов, удлиняется время свертывания крови, увеличивается продолжительность кровотечения. У свиней свертывание крови про-

исходит не за 4—5 мин, как это бывает в норме, а за 10—20 мин. Протромбиновое время увеличивается до 22,6 с при норме 14 с.

Гиповитаминоз С. Заболевание, сопровождающееся снижением порозности кровеносных сосудов, геморрагией, воспалением десен, опуханием суставов, снижением резистентности организма.

Диагностические тесты: снижение в крови содержания эритроцитов, гемоглобина, аскорбиновой кислоты. У больных взрослых свиней уровень аскорбиновой кислоты в сыворотке (плазме) крови ниже 0,2 мг/100 мл (11 мкмоль/л), у поросят — менее 0,96 мг/100 мл (55 мкмоль/л), у крупного рогатого скота — менее 0,6 мг% (34 мкмоль/л), у лошадей — 0,2 мг%, у овец — 0,4 мг% (менее 23 мкмоль/л). У больных телят содержание аскорбиновой кислоты в сыворотке крови менее 0,3 мг/100 мл (18 мкмоль/л). Содержание в молоке коров аскорбиновой кислоты ниже 10 мг/л, овец и кобыл — 40, свиней — 120 мг/л свидетельствует о развитии гиповитаминоза С.

Гиповитаминоз B_1. Заболевание, сопровождающееся расстройством функции нервной системы, ослаблением сердечной деятельности, мышечной слабостью, диспепсическими явлениями. При недостатке витамина B_1 в организме накапливаются пируваты и лактаты, в эритроцитах падает активность транскетолазы.

Диагностические тесты: содержание в сыворотке крови пировиноградной кислоты выше 1,3—1,7 мг/100 мл (138—193 мкмоль/л), молочной кислоты выше 11—13 мг/100 мл (1,4—1,44 ммоль/л), содержание общего тиамина в цельной крови ниже 7—15 мкг/100 мл, в печени — менее 10 мг/кг сырой ткани. У больных цереброкортикальным некрозом, вызванным недостатком тиамина, содержание пируватов достигает 170—560 мкмоль/л.

Гиповитаминоз B_2. Хроническое заболевание, сопровождающееся задержкой роста, поражением кожи, нервными расстройствами. Недостаточность рибофлавина чаще отмечают у птиц, пушных зверей, свиней, реже — у крупного рогатого скота и других животных.

Диагностические тесты: содержание рибофлавина в крови больных животных ниже 8—16 мкг/100 мл, в печени крупного рогатого скота менее 0,1—0,3 мг/100 г, свиней — 2,9—4,4 мг/100 г.

Гиповитаминоз РР (пеллагра). Заболевание, характеризующееся поражением кожи, желудочно-кишечного тракта и нервной системы. При недостатке никотиновой кислоты или ее амида нарушается синтез коферментов дегидрогеназы, следовательно, снижаются окислительно-восстановительные процессы и тканевое дыхание, развиваются дистрофические и атрофические процессы в коже, пищеварительном тракте, нервных клетках.

Диагностические тесты: зависят от поражения органов и систем. При преобладании поражения желудочно-кишечного тракта отмечают снижение в крови гемоглобина, эритроцитов, повышение СОЭ; при поражении кожи с развитием пиодермии наблюдается нейтрофильный лейкоцитоз.

Содержание никотиновой кислоты в печени здорового взрослого крупного рогатого скота 7,6—27,5 мг/100 г. При пеллагре ее уровень в печени значительно ниже указанных величин.

Гиповитаминоз B_6. Хроническое заболевание, характеризующееся нарушением азотистого обмена, микроцитарной анемией, поражением кожи, признаками судорог, задержкой роста. Пиридоксин в форме кофермента пиридоксальфосфата участвует в трансаминировании, дезаминировании и декарбоксилировании аминокислот. При недостатке пиридоксина в крови понижается количество эритроцитов и гемоглобина, ухудшается ее свертываемость, накапливается в организме глутаминовая кислота, что ведет к повышению возбудимости коры головного мозга и появлению эпилептических припадков и судорог.

Диагностические тесты: количество микроэритроцитов в окрашенных мазках крови составляет 90% и более общего числа эритроцитов. Снижено содержание в крови гемоглобина. В моче повышено количество ксантуровой кислоты, в крови и молоке — пиридоксина.

Недостаточность цианкобаламина (B_{12}-гиповитаминоз). Заболевание, характеризующееся прогрессирующей анемией, исхуданием, задержкой роста. Витамин B_{12} (цианкобаламин, оксикобаламин, нитрокобаламин, аквакобаламин и др.) участвует в переносе метильных групп и водорода. Он необходим для кроветворения, образования эпителиальных клеток, функционирования нервной системы, роста и процессов регенерации. В состав цианкобаламина входят кобальт, циановая группа и белок. При недостатке цианкобаламина развивается анемия, нарушается межуточный обмен белков, углеводов и жиров, задерживается рост и развитие.

Диагностические тесты: снижение в крови содержания эритроцитов, гемоглобина, цианкобаламина, кобальта.

5.2. БОЛЕЗНИ ЭНДОКРИННЫХ ОРГАНОВ

Зоб эндемический. Хроническое заболевание, характеризующееся увеличением щитовидной железы (зоб) и нарушением ее функции вследствие недостатка йода.

Диагностические тесты: содержание йода в почве ниже 0,1 мг/кг, в питьевой воде менее 2—10 мкг/л, в кормах 0,04—0,25 мг/кг сухого вещества. Снижение содержания йода, связанного с белком, в крови (в норме 4—8 мкг/100 мл, 315—630 нмоль/л). В молоке коров из свободных от зоба районов содержание йода 60—80 мкг/л, в районах йодной недостаточности значительно ниже. У больных телят содержание в сыворотке крови T_3 (трийодтиронина) составляет 1,55—4,36 нмоль/л, T_4 (тироксина) — 7,8—2,92 нмоль/л, у здоровых соответственно 2,8—4,75 и 44,26—39,72 нмоль/л (В. А. Бусол и др., 1995). Уровень в крови тиротропного гормона у больных животных бывает почти в 2 раза выше, чем у здоровых (0,74—0,23 против 0,37—0,14 мМЕ/л) (В. В. Козлов, 1999).

Гипотиреоз. Заболевание, проявляющееся гипофункцией щитовидной железы и снижением содержания в крови тироидных гормонов.

Диагностические тесты: лабораторно выявляют уменьшение концентрации в сыворотке крови T_4 (тироксина) и T_3 (трийодтиронина), повышение циркулирующего ТТГ (тиреотропного гормона). По данным В. П. Фасоля (1996), у коров при гипотиреозе концентрация в сыворотке крови T_3 составляла 0,23—1,9 нмоль/л, T_4 — 14,8—52,2 нмоль/л. Наблюдается снижение общего кальция до 8 мг/100 мл (2 нмоль/л), фагоцитарной активности нейтрофилов до 36 %. Отмечают гипохромную анемию, повышение СОЭ.

Диффузный токсический зоб (тиреотоксикоз). Аутоиммунное заболевание, обусловленное избыточной секрецией щитовидной железой тироидных гормонов и сопровождаемое токсикозом, поражением сердечно-сосудистой, нервной систем и других органов. Встречается у кошек, собак и других животных.

Диагностические тесты: повышение в сыворотке крови содержания T_3 и T_4, связанного с белком йода. Концентрация тироидных гормонов у молодняка значительно выше, чем у взрослых животных. При гипертиреозе отмечают повышение СОЭ, снижение в крови концентрации холестерина, в моче — повышение креатинина.

Гипопаратиреоз. Заболевание, обусловленное пониженной секрецией паратгормона и характеризующееся гипокальциемией и приступами тетанических судорог. Примером гипопаратиреоза, по нашим данным, является послеродовая гипокальциемия у коров.

Диагностические тесты: резкое снижение в сыворотке крови количества паратгормона, общего и ионизированного кальция и повышение неорганического фосфора. Содержание общего кальция бывает ниже 7,5 мг% (1,88 ммоль/л), ионизированного кальция — ниже 3 мг% (1,07 ммоль/л), содержание неорганического фосфора в сыворотке крови собак более 6 мг% (2 ммоль/л), повышается активность щелочной фосфатазы. При общем анализе крови выявляют нормохромную анемию, повышение СОЭ, небольшой лейкоцитоз. В моче — появление белка.

Послеродовая гипокальциемия (послеродовой парез). Остропротекающая болезнь, характеризующаяся резким снижением в крови и тканях кальция и сопровождаемая парезом гладких и поперечнополосатых мышц, параличеобразным состоянием глотки, языка, кишечника, потерей «сознания» (кома).

Болеют преимущественно высокопродуктивные коровы после 3—5 отелов. Заболевание возможно у коз, овец, буйволиц.

Диагностические тесты: снижение содержания в крови общего кальция ниже 7,5 мг% (1,84 ммоль/л), ионизированного кальция до 2—3 мг% (0,5—0,75 ммоль/л), магния — ниже 1,8 мг%, паратгормона, дигидроксивитамина D_3 [1,25 — $(OH)_2D_3$], повышение концентрации кальцитонина (И. Ф. Ганджиев, О. А. Мухина, А. А. Терликбаев).

Панкреатит. Воспаление поджелудочной железы.

Диагностические тесты: *при остром панкреатите* лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, увеличение СОЭ, увеличение активности α-амилазы, трипсина и липазы крови, возможное повышение уровня липидов, возрастание активности АсАТ и АлАТ, снижение концентрации кальция;

при хроническом панкреатите в период обострения — выраженный лейкоцитоз со сдвигом формулы влево, анемия, повышение в крови активности α-амилазы, липазы и трипсина, возможное повышение уровня билирубина, активности щелочной фосфатазы, γ-глутамилтранспептидазы вследствие холестаза. Отмечают повышение содержания γ-глобулинов в сыворотке крови. В промежутках между обострениями хронического панкреатита активность ферментов в крови соответствует норме.

Сахарный диабет. Хроническое заболевание, возникающее вследствие абсолютной или относительной недостаточности инсулина и сопровождаемое нарушением углеводного, жирового и других видов обмена веществ. Ведущим патогенетическим звеном сахарного диабета является нарушение обмена глюкозы.

Выделяют два типа сахарного диабета: I — инсулинзависимый (ИЗСД), II — инсулиннезависимый (ИНСД). У собак и других животных различия между ИЗСД и ИНСД часто стерты. Оба типа диабета характеризуются гипоинсулинемией, гипергликемией, глюкозурией и нередко кетоацидозом. Повышение глюкозы в крови (гипергликемия) — следствие недостатка гипогликемизирующего гормона инсулина или избытка гипергликемизирующих гормонов — глюкагона, адреналина и глюкокортикоидов. Абсолютный или относительный недостаток инсулина приводит к повышению содержания глюкозы в крови, появлению ее в моче, понижению проницаемости клеточных мембран для глюкозы, аминокислот, жирных кислот, фосфора, кальция, калия, натрия. Происходит мобилизация гликогена, жиров и белков с использованием их для синтеза глюкозы (неоглюкогенез). В свою очередь, неоглюкогенез сопровождается накоплением в организме недоокисленных продуктов обмена — кетоновых тел, отмечается кетонемия, кетонурия, сдвиг кислотно-щелочного равновесия в кислую сторону.

Диагностические тесты: при ИЗСД — выраженная высокая гипергликемия, глюкозурия, возможна кетонурия, ацидоз, полиурия; при ИНСД — умеренные гликемия, глюкозурия, при тяжелой форме возможен кетоацидоз. При легкой форме сахарного диабета содержание глюкозы в цельной крови, взятой у собак, свиней, лошадей натощак, превышает 95—120 мг/100 мл (5,26—6,6 ммоль/л); кетоновые тела в моче качественной пробой не обнаруживают; резервная щелочность на уровне нижней границы нормы. Считают, что у здоровых собак глюкозы в крови, взятой натощак, содержится 0,8—1,2 г/л. Если ее больше 2 г/л — это развитый сахарный диабет. Для тяжелой формы сахарного диабета, особенно ИЗСД, характер-

ны выраженная гипергликемия и глюкозурия. Содержание глюкозы в крови достигает 20—30 г/л (12,2—16,65 ммоль/л) и выше, в моче у лошадей — 3—8 %, у собак — 4—10, у свиней — до 6 %. Относительная плотность мочи 1,040—1,060, в ней обнаруживают высокую концентрацию кетоновых тел, белка. В крови устанавливают низкую резервную щелочность (кетоацидоз).

У больных сахарным диабетом в сыворотке крови выявляют снижение альбуминов, повышение γ-глобулинов, холестерина, β-липопротеидов.

Истинный сахарный диабет следует дифференцировать от почечной и алиментарной глюкозурии, несахарного диабета. Почечная глюкозурия может быть при липоидном нефрозе, гломерулонефрите, пиелонефрите, поражении канальцевого аппарата почек, вследствие чего снижается реабсорбция глюкозы в провизорной моче. При почечной глюкозурии («почечном диабете») содержание глюкозы в крови бывает в пределах нормы или ниже ее. При несахарном диабете, гипергликемии, глюкозурии не бывает кетонурии, относительная плотность мочи очень низкая.

Алиментарная глюкозурия появляется при поедании большого количества богатых сахарами кормов и исчезает при установлении нормального режима кормления.

Гипоадренокортицизм у собак и других животных. Заболевание, характеризующееся снижением секреции корой надпочечников глюкокортикоидов и минералокортикоидов.

Диагностические тесты: содержание в крови калия более 20 мг% (6 ммоль/л), натрия менее 310 мг% (135 ммоль/л), креатинина более 1,9 мг% (167 мкмоль/л), кортизона менее 50 нмоль/л.

Синдром Кушинга у собак и других животных. Заболевание, обусловленное нарушением функции гипофиз-надпочечниковой системы с преобладанием гиперкортицизма.

Диагностические тесты: увеличение концентрации гемоглобина, эритроцитов, нейтрофильный лейкоцитоз, снижение количества лимфоцитов и эозинофилов, гипергликемия, гипоальбуминемия, повышение глобулинов, холестерина, натрия. Подтверждением диагноза является повышение в крови содержания адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортизола. В моче обнаруживают белок, глюкозу, повышенное выделение с мочой 17-оксикортикоидов и 17-кетостероидов.

5.3. БОЛЕЗНИ СИСТЕМЫ КРОВИ

Анемии. Состояние, характеризующееся уменьшением содержания гемоглобина, чаще и числа эритроцитов в единице объема крови.

Выделяют алиментарную (железодефицитную) анемию, которая чаще встречается у молодняка; постгеморрагическую; гемолитическую, гипо- и апластическую анемию.

Диагностические тесты: *при алиментарной* анемии — снижение содержания гемоглобина у поросят до 40—50 г/л, у ягнят

до 54, у телят до 75 г/л и ниже. Количество эритроцитов у поросят уменьшается до $3 \cdot 10^{12}$/л, у ягнят до $4 \cdot 10^{12}$/л, у телят до $5 \cdot 10^{12}$/л и ниже; цветовой показатель ниже 0,8 (гипохромная анемия); концентрация гемоглобина снижается резче, чем число эритроцитов, уменьшается и средний объем эритроцитов; резко снижено содержание сывороточного железа (менее 100 мкг%), возможно, меди, кобальта, общего белка сыворотки крови;

при анемии постгеморрагической — снижение количества эритроцитов и гемоглобина, появление в крови незрелых форм эритроцитов. В первые дни увеличение числа лейкоцитов, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, относительная лимфопения, нарастание количества ретикулоцитов. Снижение в крови уровня железа;

при анемии гемолитической — в крови умеренная анемия, лейкопения, тромбоцитопения, ускоренная СОЭ, увеличение числа ретикулоцитов, диаметр эритроцитов уменьшен, осмотическая стойкость снижена (гемолизированная сыворотка), содержание билирубина повышено. В моче — наличие уробилина, билирубина, гемоглобина;

при анемии мегалобластической (B_{12}-дефицитная) — снижение количества эритроцитов, изменение их структуры (макроцитоз, анизоцитоз, пойкилоцитоз), цветовой показатель выше 1,1, снижение числа лейкоцитов и тромбоцитов, увеличение СОЭ, повышение уровня билирубина в крови, активности ЛДГ, снижение содержания витамина B_{12};

при анемии гипо- и апластической (анемия нормохромная) — выраженная лейкоцитопения, лимфоцитопения, тромбопения. Резкое снижение в крови количества нейтрофилов и тромбоцитов свидетельствует о неблагоприятном прогнозе. Уровень сывороточного железа повышен. В костномозговом пунктате — уменьшение количества клеток всех ростков кроветворения.

Гемобластозы. Новообразования, развивающиеся из клеток кроветворной ткани. В зависимости от локализации процесса различают лейкозы — заболевания с поражением костного мозга и лимфомы — болезни с начальной локализацией вне костномозговой ткани.

Лейкоз крупного рогатого скота. Хроническое заболевание опухолевидной природы с поражением костного мозга и других органов.

Диагностические тесты: основной метод выявления специфических антител в крови — реакцией иммунодиффузии (РИД) или иммунофлуоресценции (РИФ) и иммуноферментного теста. При исследовании крови выявляют лейкоцитоз с преобладанием лимфоцитов, пользуясь лейкозным ключом (табл. 45).

При исследовании костного мозга выявляется повышенное содержание незрелых форм клеток.

Лимфогранулематоз. Заболевание, относящееся к злокачественным опухолям лимфатической системы.

Диагностические тесты: лабораторно выделяют нейтрофильный лейкоцитоз, иногда лейкопению, понижение количества

45. Лейкозный ключ для выявления лейкоза

Возраст животного	Здоровые животные	Подозрительные по заболеванию	Больные
	Лейкоцитов, тыс/мкл	Лимфоцитов, тыс/мкл	Лимфоцитов, тыс/мкл
1—2 года	До 13	10—13,0	Свыше 13
2—4 »	» 11	8—10,0	» 10
4—6 лет	» 10	6,5—9,0	» 9
6 лет и старше	» 9	5,5—8,0	» 8

эритроцитов, гемоглобина, увеличение СОЭ. В сыворотке крови констатируют повышение содержания α_1-, α_2-глобулинов, гаптоглобулинов. В биопунктате лимфатических узлов находят полиморфноклеточную гранулему, специфические клетки Березовского—Штернберга.

Иммунные дефициты. Заболевания характеризуются тем, что организм не в состоянии адекватно реагировать на чужеродные антигены. Они наиболее часто встречаются у молодняка, ослабленных, истощенных, старых животных.

Диагностические тесты: снижение в сыворотке крови содержания иммунных белков, фагоцитарной активности нейтрофилов и эозинофилов, уменьшение иммунных глобулинов, лейкоцитов в молозиве. Характерный признак иммунного дефицита у телят первых суток жизни — снижение содержания в сыворотке крови общего белка: в первые сутки — менее 45—48 г/л, в возрасте 2—3 дней — менее 55 г/л при концентрации Ig менее 15 г/л. У поросят содержание Ig в сыворотке крови менее 30 г/л, у ягнят 15—17 г/л свидетельствует об иммунном дефиците.

Следующий показатель состояния иммунной защиты новорожденных — содержание Ig в молозиве. В полноценном молозиве коров первого удоя оно составляет 50—100 г/л, в молозиве второго удоя снижается на 45 %, третьего — на 75 %. В молозиве свиноматок уровень Ig равен 55 —71 г/л.

При оценке состояния естественной резистентности организма определяют фагоцитарную активность нейтрофилов крови — количество активных фагоцитов или фагоцитирующих клеток в процентах и фагоцитарный индекс — количество микробов, захваченных в среднем одним фагоцитом. Фагоцитарная активность нейтрофилов крупного рогатого скота 33—60 %, свиней 45—62 %, фагоцитарный индекс — соответственно 5—10 и 5—8 микробных тел. О низкой резистентности организма свидетельствует лейкопения (менее $5 \cdot 10^9$/л).

5.4. БОЛЕЗНИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ

Перикардит. Воспаление наружного листка сердца и сердечной сумки.

Диагностические тесты: нейтрофильный лейкоцитоз, повышение СОЭ, содержания в сыворотке крови α- и β-глобулинов, резкое повышение активности АсАТ, АлАТ (И. П. Кондрахин).

Миокардит. Воспаление сердечной мышцы инфекционно-аллергической или инфекционно-токсической природы, сопровождаемое тяжелым общим состоянием животного и сердечной недостаточностью.

Диагностические тесты: умеренный лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, увеличение СОЭ, активности АсАТ, АлАТ, ЛДГ, креатинфосфокиназы, при нормальных показателях активности малатдегидрогеназы и холинэстеразы. В сыворотке крови увеличен уровень сиаловых кислот, серомукоида, гаптоглобина, α_2- и γ-глобулинов, в крови — противомиокардиальные антитела и циркулирующие иммунные комплексы.

Инфаркт миокарда. Острое заболевание, характеризующееся развитием некроза отдельных участков сердечной мышцы на почве ишемии.

Диагностические тесты: в острой стадии заболевания — резкое повышение в крови активности АсАТ, АлАТ, креатинфосфокиназы, несколько позже ЛДГ. Отмечают возрастание СОЭ, лейкоцитоз, который с ослаблением патологического процесса исчезает.

Эндокардит. Воспаление эндокарда, чаще с поражением клапанов.

Диагностические тесты: гипохромная анемия, увеличение СОЭ. После эмболии сосудов почек и других органов развивается лейкоцитоз.

Атеросклероз. Заболевание, характеризующееся отложением в стенках сосудов липопротеидов с последующим формированием атеросклеротических бляшек, разрастанием соединительной ткани.

Диагностические тесты: повышение содержания в сыворотке крови общего холестерина, триглицеридов, липопротеидов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеидов низкой плотности (ЛПНП или β-липопротеидов), НЭЖК.

5.5. БОЛЕЗНИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Бронхит. Воспаление бронхов.

Диагностические тесты: при остром бронхите и обострении хронического заболевания — нейтрофильный лейкоцитоз, повышение в крови уровня белков острой фазы, α_2- и γ-глобулинов.

Крупозная пневмония. Острое лихорадочное заболевание, характеризующееся гиперэргическим воспалением легких лобарного типа.

Диагностические тесты: выраженный нейтрофильный лейкоцитоз ($13—20 \cdot 10^9$/л), при снижении числа эозинофилов и

лимфоцитов, повышение СОЭ. У ослабленных, старых животных лейкоцитоз не отмечается. В крови — повышение содержания α_2- и γ-глобулинов, серомукоида, фибрина, сиаловых кислот, а также активности $ЛДГ_3$, АсАТ, АлАТ, появление С-реактивного белка.

Бронхопневмония. Воспаление бронхов и легких преимущественно катарального типа.

Диагностические тесты: в крови — умеренный нейтрофильный лейкоцитоз ($12—15 \cdot 10^9$/л), повышение СОЭ, содержания общего белка в сыворотке крови за счет глобулиновых фракций. Для диагностики и прогнозирования бронхопневмонии используют бронхолегочный тест (И. П. Кондрахин, 1998) с 75 мг%-ным раствором сульфата цинка. У клинически здоровых телят в возрасте 1—3 мес величина бронхолегочного теста составляет 1,7—2,7 мл, при легкой и средней тяжести болезни — 1,5—1,3 мл и ниже, при тяжелом затяжном течении — 1,2 мл и менее. При показателе бронхолегочного теста 0,9—0,8 мл и менее прогноз неблагоприятный. Повышение показателя бронхолегочного теста свидетельствует о положительном лечебном эффекте, снижение — о неэффективной терапии.

Плеврит. Воспаление плевральных листков плевры.

Диагностические тесты: в крови умеренный лейкоцитоз, увеличение СОЭ, повышение содержания сиаловых кислот, серомукоида, глобулинов. В плевральном серозном экссудате pH щелочной, в гнойном — кислый. В мазках-отпечатках экссудата большое количество лейкоцитов, при геморрагическом плеврите и эритроцитов.

5.6. БОЛЕЗНИ ОРГАНОВ ПИЩЕВАРЕНИЯ

Ацидоз рубца. Заболевание, возникающее вследствие образования в рубце большого количества молочной кислоты и сопровождающееся снижением pH рубцового содержимого, нарушением пищеварения и ацидотическим состоянием организма.

Диагностические тесты: pH рубцового содержимого снижается до 5—4 и ниже (норма у коров 6,5—7,2, у овец 6,2—7,3), количество инфузорий уменьшается до 62,5 тыс/мл и менее (норма у коров 200—1200 тыс/мл, у овец 250—1800 тыс/мл), падает их подвижность, содержание молочной кислоты выше 40—50 ммоль/100 мл (в норме следы — 20 ммоль/100 мл). В крови содержание молочной кислоты 40 мг/100 мл (4,4 ммоль/л) и выше, резервная щелочность падает до 35 об.% CO_2, уменьшается уровень гемоглобина до 67 г/л, незначительно повышается концентрация сахара (до 62,3 мг%, или до 3,46 ммоль/л). Активная реакция мочи (pH) снижается до 5,6, иногда в ней обнаруживается белок. При остром ацидозе рубца у овец pH содержимого рубца снижается до 4,3—4,5, количество молочной кислоты возрастает до 75 мг% (8,3 ммоль/л).

Алкалоз рубца. Заболевание, характеризующееся сдвигом pH рубцового содержимого в щелочную сторону, нарушением рубцового пищеварения, обмена веществ, функции печени и других органов.

Диагностические тесты: pH содержимого рубца 7,2—7,3, концентрация аммиака более 16,1 мг/100 мл (норма у коров 6,5—25 мг/100 мл, у овец 6,5—35 мг/100 мл), количество инфузорий снижается до 66 тыс/мл и ниже, падает их активность. Повышается содержание общего белка в сыворотке крови, достигая 113 г/л, резервная щелочность — 64 об.% CO_2 и выше. Положительная белково-осадочная проба как следствие поражения печени. pH мочи выше 8,4, возможно обнаружение белка.

Гастрит. Воспаление слизистой оболочки желудка.

Диагностические тесты: при гиперацидном гастрите в содержимом желудка увеличение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гиперхлоргидрия); при гипоцидном гастрите уменьшение количества свободной соляной кислоты и общей кислотности (гипохлоргидрия). В желудочном содержимом здоровых лошадей общая кислотность равна 24—36 титр. ед., свободная соляная кислота 20—28 титр. ед., у собак соответственно 35—70 и 14—36 титр. ед., у свиней — 30—60 и 10—30 титр. ед. Активная реакция (pH) содержимого желудка у лошадей 1,9—4,0, у собак 1,7—3,5, у свиней 1,8—4,5.

При остром гастрите в несколько раз увеличивается количество лейкоцитов в желудочном соке (желудочный лейкопедез): у лошадей более 500 лейкоцитов в 1 мкл осадка, у собак более 180 в 1 мкл. В кале возможно обнаружение скрытой крови.

При хроническом гастрите устанавливают показатели, характеризующие повышенную, нормальную или пониженную кислотообразующую функцию желудка. При нормальной или повышенной секреторной функции содержание соляной кислоты в желудочном соке в норме или повышено, при секреторной недостаточности — ее концентрация снижена. В крови понижен уровень гемоглобина, эритроцитов (анемия). Проводят исследования на хеликобактерии.

Язвенная болезнь желудка. Хроническое рецидивирующее заболевание с образованием в стенке пептической язвы.

Диагностические тесты: повышение кислотности желудочного сока, гиперсекреция, появление крови в кале, обнаружение хеликобактерий. При общем анализе крови — снижение уровня гемоглобина и эритроцитов, умеренный лейкоцитоз, ускорение СОЭ, нарушение кислотно-щелочного состояния, водно-электролитного обмена.

Энтерит. Воспаление тонкого кишечника. **Колит.** Воспаление толстого кишечника.

Диагностические тесты: при хроническом энтерите умеренная анемия, снижение уровня общего белка сыворотки крови, глюкозы, холестерина, железа, электролитов. В кале — повышенное содержание жира, pH при гнилостном процессе щелочной, при бродильном кислый. При хроническом колите, его обострении возможен лейкоцитоз, ускорение СОЭ. При язвенном колите в кале слизь, лейкоциты, эритроциты, клетки кишечного эпителия, в моче белок. В сыворотке крови снижение количества

альбуминов и повышение γ-глобулинов, серомукоида, сиаловых кислот.

Диспепсия молодняка. Остропротекающая болезнь новорожденных животных, характеризующаяся расстройством пищеварения, обмена веществ, возможны обезвоживание и интоксикация организма.

Диагностические тесты: при легкой форме лабораторные показатели не характерны; при тяжелой (токсической) форме резервная щелочность снижается до 19 об.% CO_2 и ниже (норма 45—66 об.% CO_2), уровень мочевины достигает 200 мг/100 мл (норма 14—22 мг/100 мл) (И. П. Кондрахин), повышается концентрация аммиака. Гематокритная величина выше 40 %.

5.7. БОЛЕЗНИ ПЕЧЕНИ И ЖЕЛЧНЫХ ПУТЕЙ

Гепатит. Воспаление печени диффузного характера, сопровождающееся гиперемией, клеточной инфильтрацией, дистрофией, некрозом и лизисом гепатоцитов и других структурных элементов, выраженной печеночной недостаточностью.

Диагностические тесты: в крови лейкопения (при вирусном гепатите), лейкоцитоз — при осложненном гепатите, повышение содержания билирубина, активность АсАТ, АлАТ, ЛДГ и ее изоферментов $ЛДГ_{4,5}$, альдолазы, глутаматдегидрогеназы, γ-глутамилтрансферазы (В. И. Левченко). Снижение в сыворотке крови альбуминов. При хроническом гепатите — положительная белково-осадочная проба, ускорение СОЭ, лимфопения, повышение активности указанных выше ферментов, а также щелочной фосфатазы, уровня γ-глобулинов, билирубина, β-липопротеинов, желчных кислот, фосфолипидов.

Жировой гепатоз. Заболевание, характеризующееся накоплением триглицеридов в гепатоцитах и нарушением основных функций печени.

Диагностические тесты: в крови снижение уровня глюкозы (у коров ниже 2,22 ммоль/л), повышение содержания билирубина (более 10,3 мкмоль/л), холестерина (более 3,9 ммоль/л). При токсической дистрофии печени — повышение активности АлАТ, АсАТ, ЛДГ.

Цирроз печени. Хроническое прогрессирующее заболевание, характеризующееся дистрофией и некрозом паренхимы печени, сопровождающееся диффузным разрастанием соединительной ткани.

Диагностические тесты: снижение числа эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов в крови, увеличение СОЭ, уровня билирубина, активности щелочной фосфатазы, γ-глутамилтранспептидазы, АлАТ, общих липидов, снижение содержания альбуминов и холестерина; протеинурия, наличие билирубина в моче; белково-осадочные пробы положительные.

Холецистит. Воспаление желчного пузыря.

Диагностические тесты: нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом формулы крови влево; повышение СОЭ, уровня билиру-

бина, α_2- и γ-глобулинов, серомукоида, фибрина, сиаловых кислот, гаптоглобина, активности АлАТ, АсАТ, γ-глутамилтранспептидазы; возможен билирубин в моче.

Желчно-каменная болезнь. Заболевание, характеризующееся образованием желчных камней в желчном пузыре и желчных протоках, связанное с нарушением обменных процессов.

Диагностические тесты: устанавливают повышение уровня билирубина, активности щелочной фосфатазы, АсАТ, АлАТ, γ-глутамилтранспептидазы в крови; при желтухе в моче билирубин.

5.8. БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Гломерулонефрит. Иммунновоспалительное заболевание с преимущественным поражением клубочков и в меньшей степени канальцев и интерстициальной ткани почек.

Диагностические тесты: при остром гломерулонефрите — повышенное или нормальное содержание в крови мочевины и креатинина, лейкоцитов. Содержание общего белка сыворотки крови снижено за счет альбуминов, количество α_2- и γ-глобулинов повышено. В моче через несколько дней от начала заболевания — значительная протеинурия, наличие эритроцитов.

При хроническом гломерулонефрите и обострении процесса в крови снижается уровень гемоглобина, эритроцитов, общего белка сыворотки крови за счет альбуминов и повышается содержание α_2- и β-глобулинов, сиаловых кислот, серомукоида, фибриногена. В моче устанавливают понижение относительной плотности, выраженную протеинурию, гематурию.

Острая почечная недостаточность. Происходит внезапное нарушение фильтрационной, экскреторной и секреторной функций почек. Причины — острый гломерулонефрит, иммуноаллергическое поражение почек, отравление медью, ртутью, кадмием, синильной кислотой, афлатоксинами, ядовитыми растениями; наблюдают при токсической диспепсии телят. Эти причины вызывают прежде всего поражения клубочкового аппарата почек и развитие азотемии.

Диагностические тесты: наблюдают высокий уровень мочевины, креатинина, магния, фосфора, снижение уровня натрия, кальция, хлоридов в крови. При общем анализе ее устанавливают нейтрофильный лейкоцитоз, гипохромную анемию. В организме развивается метаболический ацидоз (снижение резервной щелочности). Моча содержит много эритроцитов, белка и цилиндров, клеток почечного эпителия.

Хроническая почечная недостаточность. Заболевание, характеризующееся снижением функций клубочков и канальцев, выраженным нарушением гомеостаза. Хроническая почечная недостаточность возникает вследствие прогрессирующих хронических заболеваний почек, сопровождаемых гибелью большого числа нефронов. К таким заболеваниям относятся: хронический гломерулонефрит, пиелонефрит, хронические отравления солями тяжелых металлов,

токсинами грибов, ядами растительного происхождения. К этиологическим факторам относятся обструктивные заболевания верхних и нижних мочевых путей (камни, опухоли, рак мочевого пузыря и др.).

Диагностические тесты: в крови высокая концентрация азотных шлаков (мочевины, креатинина, мочевой кислоты), фосфора, калия, магния, снижение уровня кальция, натрия, резервной щелочности; характерны гипопластическая анемия, снижение количества гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов. В моче белок, цилиндры, эритроциты.

Пиелонефрит. Одновременное или последовательное воспаление паренхимы и лоханки почки.

Диагностические тесты: нейтрофильный лейкоцитоз, увеличение СОЭ, снижение количества эритроцитов (гипохромная анемия) в крови. При развитии хронической почечной недостаточности выявляют признаки, характерные для этого состояния: повышение содержания остаточного азота и др. В моче pH выше 8,0, она содержит примесь гнойных хлопьев, много лейкоцитов, микробных тел, зернистых цилиндров и др. В фазе ремиссии лейкоциты могут отсутствовать.

Мочекаменная болезнь. Заболевание, сопровождающееся образованием и отложением мочевых камней в почечной лоханке, мочевом пузыре, уретре.

Диагностические тесты: после почечной колики в моче кровь; присоединение инфекции (пиелонефрит и др.) вызывает лейкоцитурию, появление белка в моче. При уратах реакция мочи стойкая кислая, при оксалатах — слабокислая, при фосфатурии — щелочная. В моче обнаруживают те или иные кристаллы. В крови в период ремиссии существенных изменений не находят. Во время почечной колики или обострения пиелонефрита выявляют лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, ускорение СОЭ.

Цистит. Воспаление стенки мочевого пузыря.

Диагностические тесты: в крови небольшой нейтрофильный лейкоцитоз и ускорение СОЭ; в моче осадок белка, возможна кровь (в конце мочеиспускания); в осадке мочи лейкоциты, эритроциты, эпителий мочевого пузыря.

5.9. АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ БОЛЕЗНИ

Кровопятнистая болезнь. Заболевание, проявляющееся обширными симметрическими отеками и кровоизлияниями.

Диагностические тесты: при остром течении в крови незначительный лейкоцитоз, в дальнейшем возможна лейкопения. Количество эритроцитов и гемоглобина снижено; в сыворотке крови резкое повышение билирубина (до 12 мг/100 мл, 200 мкмоль/л). В моче обнаруживают белок, гемоглобин, повышенное содержание уробилиногена, форменных элементов крови.

Крапивница. Заболевание, характеризующееся аллергической кожной реакцией немедленного типа, вызванной разнообразными экзогенными и эндогенными факторами.

Диагностические тесты: повышение билирубина в крови как следствие поражения печени. Моча красно-коричневого цвета, содержит билирубин.

Сывороточная болезнь. Аллергическое заболевание, возникающее в ответ на парентеральное введение чужеродного белка (сыворотка, вакцина и др.) и характеризующееся преимущественным поражением сосудов и соединительной ткани. Заболевание развивается в ответ на первичное или повторное (через 7—10 дней) введение сыворотки, вакцины или другого белкового препарата.

Диагностические тесты: в разгар заболевания умеренный лейкоцитоз, снижение количества эозинофилов крови, в последующем лейкоцитоз сменяется лейкопенией, устанавливают относительный лимфоцитоз, тромбоцитопению, ускорение СОЭ, снижение свертываемости крови. В моче обнаруживают белок.

5.10. АУТОИММУННЫЕ БОЛЕЗНИ

Болезни, возникающие под воздействием аутоантител, т. е. антител, образующихся в собственном организме или поступающих извне с молозивом (молоком) матери. При этих болезнях происходит структурно-функциональное повреждение тканей органов.

Диагностические тесты: аутоантитела и иммунные комплексы аутоантигенных аутоантител в крови. На месте внутрикожного введения антигенов развивается положительная аллергическая реакция. При аутоиммунных анемиях (аутоиммунная гемолитическая болезнь новорожденных) отмечается резкое снижение в крови эритроцитов и гемоглобина, увеличение числа ретикулоцитов, нормоцитов (ядерных), эритроцитов. При аутоиммунной гемолитической болезни новорожденных животных в сыворотке крови повышенный уровень билирубина. В крови и молозиве устанавливают наличие противоэритроцитарных антител, положительную реакцию гемолиза эритроцитов с сывороткой молозива или крови матери (самки). При положительной реакции часть эритроцитов подвергается гемолизу и сыворотка окрашивается в красный цвет.

ГЛАВА 6

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Взятие содержимого рубца и подготовка для анализов. Содержимое рубца у интактных животных берут при помощи ротоглоточных и носоглоточных зондов; при необходимости его берут путем пункции вентрального мешка рубца. Экспериментально процессы пищеварения в преджелудках изучают на животных с фистулами. В последние годы сконструирован искусственный рубец, что дает возможность изучать ферментативные процессы in vitro. Зонд Черкасова предназначен для выведения газов и промывания рубца и малопригоден для получения его содержимого. У взрослого крупного рогатого скота содержимое рубца берут резиновыми или полихлорвиниловыми шлангами длиной 200—250 см и наружным диаметром 20—40 мм. На 15—20-сантиметровом отрезке переднего конца такого шланга делают небольшие отверстия на случай закупорки основного хода. В странах Западной Европы изготавливают ряд ротоглоточных зондов различной модификации, используемых для получения проб рубцового содержимого. Для зондирования рубца овец, коз и молодняка крупного рогатого скота можно использовать выпускаемые медицинской промышленностью желудочные зонды длиной 120—150 см, наружным диаметром около 15 мм.

Мягкой трубкой зондируют через деревянный зевник, отверстие которого несколько больше диаметра зонда. Нажимая пальцами на массетеры, зевник вставляют как можно ближе к углу рта и фиксируют его за рогами тесемками. Предварительно смазанный вазелиновым маслом рубцовый конец зонда вводят на корень языка и осторожно продвигают в пищевод, слегка двигая вперед и назад для того, чтобы вызвать у животного акт глотания. При попадании зонда в трахею животное беспокоится и кашляет. В этом случае зонд следует немного вытянуть и придать ему пищеводное направление. При попадании зонда в рубец ощущается запах содержимого или оно вытекает. Для лучшего извлечения рубцового содержимого голову животного необходимо максимально опустить вниз, массировать левую голодную ямку и подвигать зондом вперед и назад. Можно содержимое рубца откачивать с помощью вакуумного насоса Камовского в колбу Бунзена. У молодняка крупного и мелкого рогатого скота содержимое извлекают, присоединив к зонду шприц Жанэ.

При необходимости небольшое количество содержимого рубца можно получить путем пункции его вентрального мешка. Прокол делают на стоячем животном краниальнее левой коленной складки иглой для аортопункции. Жидкость отсасывают с помощью шприца.

У животных с фистулами рубца содержимое берут металлической трубкой длиной около 1 м и диаметром отверстия 0,5 см. Трубку вводят через фистулу в вентральный мешок рубца. Для отсасывания содержимого используют шприц Жанэ, присоединенный к трубке.

Для поддержания температуры и сохранения активности микрофлоры содержимого рубца его целесообразно отбирать в термос. Во время исследований содержимое рубца хранят при комнатной температуре (20—22 °С) не более 9 ч, а в холодильнике — не более 1 сут. При транспортировке из хозяйств пробы необходимо помещать в термос со льдом. Для предупреждения лизиса простейших и бактерий пробы консервируют 10%-ным раствором формалина (5—6 капель на 20 мл содержимого рубца). Для определения летучих жирных кислот, лактата, аминокислот, биогенных аминов, ионов (Cl^+, Na^+, K^+ и др.) рубцовое содержимое можно хранить в замороженном состоянии около 6 мес. Аммиак следует определять в свежем содержимом. Перед использованием пробы фильтруют через 2—4 слоя марли.

6.1. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Органолептическое исследование содержимого рубца проводят сразу же после его получения непосредственно в хозяйстве. При этом определяют запах, цвет, осадок, флотацию.

Цвет. У здоровых животных цвет содержимого рубца зависит от потребляемого корма. В большинстве случаев оно от серо-зеленого до коричнево-зеленого цвета, во время выпаса или при кормлении сеном — бурого или коричнево-зеленого, при скармливании жома — серого, кукурузного силоса и соломы — желто-коричневого цвета. Темно-коричневый или темно-зеленый цвет свидетельствуют о застое или гниении содержимого рубца. При остром ацидозе рубца содержимое его молочно-серого, а при хроническом ацидозе — молочно-коричневого цвета.

Консистенция. Содержимое рубца слабовязкой (тягучей) консистенции, которая при нарушении пищеварения может становиться водянистой, пенистой или вязкой (густой). Водянистая консистенция указывает на понижение ферментативных процессов в преджелудках и развитие острого ацидоза. При тимпании содержимое рубца пенистое. Вязкая консистенция отмечается при хроническом ацидозе рубца, но может быть и вследствие попадания большого количества слюны в пробу содержимого.

Запах. У здоровых животных запах содержимого рубца специфический, ароматный и зависит от рациона. Резкий запах может быть при кормлении зеленой травой, свеклой, капустой, силосом. Запах тухлых яиц или аммиачный отмечают при гниении содержимого. Затхлый или иного рода неприятный запах — результат снижения активности микрофлоры и ферментативных процессов в рубце. Кисловатый запах характерен для хронического ацидоза рубца, а резко кислый — для острого ацидоза. Затхлый и кисловатый запахи возможны при попадании содержимого сычуга в преджелудки вследствие нарушения его проходимости и при антиперистальтике.

Осадок и флотация. Свежее содержимое рубца наливают в стеклянный цилиндр или стакан, отмечая время осаждения и флотации. В содержимом рубца здоровых животных значительная часть переваренного корма осаждается (осадок), а грубые неперевареные с пузырьками газа (брожение) компоненты поднимаются на поверхность и собираются с виде плавающей прослойки (флотация).

Оценивая образования осадка и флотации, необходимо отметить начало первой осадочной и флотационной фазы. При нормальном пищеварении в преджелудках и в зависимости от типа рациона и времени последнего кормления осаждение и флотация в большинстве случаев завершаются через 4—10 мин. В случаях нарушения пищеварения и водянистой консистенции содержимого ускоряется выпадение осадка, а флотация задерживается или отсутствует. Это наблюдают при инактивации микрофлоры, анорексии или недостаточном кормлении. Быстрый осадок без флотации характерен для ацидоза рубца, задержка осаждения и флотации — следствие застоя, гниения содержимого рубца и пенистой тимпании.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Реакция среды рубца — важный показатель, который определяет состояние ферментативных процессов, образование метаболитов, их всасывание и использование в организме. Характеризуется реакция среды концентрацией ионов водорода, или водородным показателем. Величина pH — отрицательный логарифм концентрации ионов водорода. Это означает, что для 0,1 ммоль/л раствора какой-либо сильной кислоты pH равен 1, для чистой воды — 7, для 0,1 ммоль раствора сильной щелочи — 13. Соответственно кислая реакция определяется концентрацией ионов водорода H^+, а щелочная — концентрацией ионов гидроксида OH^-; при нейтральной реакции pH равен 7.

В растворах pH определяют двумя методами — колориметрическим и электрометрическим. Первый наиболее простой, но не совсем точный метод базируется на свойстве некоторых индикаторов изменять цвет в зависимости от реакции среды. Этим методом сложно определить pH в мутных и окрашенных растворах, в том числе и в содержимом рубца.

Электрометрический метод. Применяют при работе с окрашенными растворами и суспензиями, им довольно быстро можно определить pH с точностью до 0,05.

Принцип. Метод основывается на том, что при погружении электрода в раствор возникает разница потенциалов между ионами металла электрода и ионами этого же металла, который находится в растворе. Если в это же время погрузить еще и стандартный электрод с известным и стойким потенциалом, то электродвижущая сила гальванического элемента будет зависеть от концентрации ионов металла в растворе. Определяют электродвижущую силу при помощи pH-метра (ЛПУ-0,1; pH-метр-262, ОР-204/1; универсальный ионометр ЭВ-74).

Ход определения. Основной и вспомогательный электроды готовят к работе по инструкции к прибору. Прибор предварительно калибруют. При измерении pH необходимо учитывать температуру исследуемой жидкости. При определении pH содержимого рубца нажимают кнопку с диапазоном определения 4—9.

Содержимое рубца хорошо размешивают, выливают в стаканчик и погружают электроды, предварительно промытые дистиллированной водой и обсушенные фильтровальной бумагой. Фиксируют показатели на шкалах прибора. Для более точного измерения их учитывают через 1—3 мин, поскольку за это время наступает состояние равновесия между электродами и раствором. По окончании измерений прибор выключают, электроды тщательно промывают и погружают в стаканчик с дистиллированной водой.

Колебания pH содержимого рубца зависят главным образом от уровня в нем бикарбонатов, фосфатов и слабых органических кислот. У жвачных животных pH содержимого 6,5—7,2, у высокопродуктивных коров 6,3—6,8. Он поддерживается в рубце в результате: а) поступления щелочи в рубец со слюной и кормом (ежедневно в рубец со слюной попадает 370—520 г $NaHCO_3$); б) эвакуации из рубца кислот вследствие их всасывания в кровь и перехода с химусом в нижерасположенные отделы пищеварительного канала; в) буферных свойств содержимого рубца (бикарбонаты, фосфаты, белок и др.) и самих органических кислот.

В кислую сторону pH содержимого рубца (4,0—5,6) смещается при внезапном или чрезмерном поступлении в рубец с кормами легкоусвояемых углеводов (сахарная свекла, кукуруза молочно-восковой спелости, патока, яблоки, зерновые концентраты). В рубце интенсивно развивается молочнокислое брожение, что приводит к обильному образованию молочной кислоты, которая вызывает сдвиг pH в кислую сторону.

При повышенной кислотности отмечают признаки острого расстройства пищеварения, животные теряют аппетит, наступает атония или тимпания рубца, акт дефекации учащается, количество инфузорий уменьшается. У некоторых животных отмечают тремор мышц, брадикардию.

Под влиянием молочнокислых бактерий разрушаются некоторые аминокислоты, образуются вредные протеиногенные амины (гистамин, тирамин, кадаверин), которые всасываются в кровь и способствуют развитию ламинита и гипотонии преджелудков.

Смещение pH содержимого рубца в щелочную сторону (больше 7,2) называется алкалозом. Наблюдается при поедании большого количества травы бобовых растений и других высокобелковых кормов или небелковых азотистых продуктов. Щелочная реакция среды сопровождается гипотонией рубца, угнетением функции инфузорий, симбионтных бактерий и даже их гибелью, нарушением бродильных процессов в преджелудках. Интенсивно развиваются гнилостные микроорганизмы, которые используют белок и аминокислоты с образованием токсических соединений (фенол, крезол, индол, скатол и др.). Болезнь проявляется при повышении концентрации аммиака в содержимом рубца до 25 мг/100 мл и больше (в норме 6,5—20). Микрофлора не успевает использовать аммиак для синтеза микробного белка, а печень — превращать его в мочевину, поэтому аммиак всасывается в кровь и ликвор, вызывая интоксикацию.

6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕГО КОЛИЧЕСТВА ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ (ЛЖК)

Принцип. Под воздействием пара происходит отгонка летучих жирных кислот рубцового содержимого с последующим определением их количества путем титрования раствором щелочи.

Реактивы: смесь насыщенного раствора магния сульфата и 2,5%-ном растворе H_2SO_4. 25 мл концентрированной серной кислоты на 1 л насыщенного раствора магния сульфата;

0,1 н. раствор NaOH;

фенолфталеин (индикатор).

Оборудование: аппарат Маркгама; электроплита (нагреватель); штатив для титрования; лабораторная посуда.

Ход определения. Из общей пробы профильтрованного содержимого рубца отбирают в стаканчик 5 мл жидкости и добавляют 5 мл раствора магния сульфата. После этого 4 мл полученной смеси (эквивалент 2 мл жидкости рубца) переносят в аппарат Маркгама для отгонки (рис. 8). Пробу осторожно выливают во

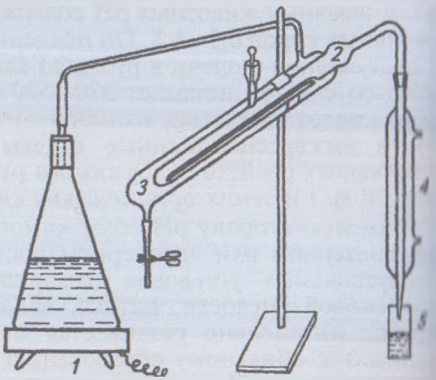


Рис. 8. Схема определения летучих жирных кислот в аппарате Маркгама:
1 — колба на нагревателе; *2* — внутренняя воронка; *3* — внешняя воронка; *4* — холодильник; *5* — стаканчик для сбора конденсата ЛЖК

внутреннюю трубку прибора через воронку. При этом водяной пар из парообразователя проходит между внутренней и внешней трубками аппарата, нагревает внутреннюю трубку, а затем через отверстие поступает во внутреннюю камеру. Под действием пара происходит отгонка ЛЖК, которые вместе с водяным паром попадают в холодильник, где они конденсируются. Отбирают в стаканчик 50 мл жидкости и титруют 0,1 н. раствором щелочи в присутствии индикатора фенолфталеина до появления слабо-розового цвета. Отмечают количество щелочи, пошедшее на титрование.

С целью контроля полного удаления ЛЖК из пробы рубцового содержимого необходимо продолжить дистилляцию и протитровать вторую порцию дистиллята (50 мл). В случае отсутствия ЛЖК во второй пробе жидкость в стаканчике после добавления нескольких капель щелочи сразу же становится розового цвета.

Отработанная проба из внутренней камеры после охлаждения парообразователя собирается в нижней части вместе с конденсатом водяного пара, откуда ее удаляют.

Расчет общего количества ЛЖК ведут по формуле

$$x = A \cdot 0{,}1 \cdot 1000/Б, \text{ или } x = A \cdot 50,$$

где x — количество ЛЖК в 100 мл рубцовой жидкости, ммоль/л; A — количество 0,1 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл; 0,1 — показатель нормальности раствора; 1000 — пересчет концентрации ЛЖК на 1 л рубцовой жидкости; $Б$ — количество рубцовой жидкости, взятой для анализа (в данном случае 2 мл); 50 — стабильная величина.

В содержимом рубца коров общее количество ЛЖК в норме составляет 80—150 ммоль/л (в среднем 120 ммоль/л).

Клиническое значение. Общее количество ЛЖК в содержимом рубца жвачных животных зависит от состава рациона, вида и химического состава корма, технологии его приготовления, концентрации клетчатки (оптимальная 18—20 %) и крахмала (оптимальная 11—14 %) в сухом веществе рациона.

Уменьшается синтез ЛЖК при некоторых болезнях, например, при смещении сычуга у коров их количество составляет 60—70 ммоль/л (А. В. Чуб, 2002).

Источники: 29, 40.

6.4. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Принцип. Под действием высокой температуры (210 °С) кислоты начинают выпариваться. Проходя через колонку, заполненную хромосорбом-101, они полностью отделяются одна от другой. Попадая в детектор, сгорают в пламени чистого водорода, образуя при этом определенный электрический потенциал, который регистрируется самописцем в виде пиков. Чем больше кислоты содержится в исследуемой пробе, тем выше будет высота пика.

Реактивы: стандарты летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, изомасляной, валериановой и др.) со степенью чистоты не менее 99 %;

сорбент хромосорб-101.

Оборудование: разовый хроматограф «Хром-5»; генератор водорода «Водень-1»; компрессор; баллон с азотом; стеклянная колонка длиной 1,5 м, заполненная хромосорбом-101; самописец; рулон бумаги с миллиметровыми отметками; карандаш для записи показателей; микрошприц; лабораторные весы ВЛР-200; навески не менее 2-го класса точности.

Ход определения. Перед исследованием готовят стандарты: смесь ЛЖК в таком соотношении, чтобы оно приблизительно соответствовало средним показателям содержания летучих жирных кислот, которые находятся в содержимом рубца. Прибор «Хром-5» перед работой прогревают в течение 1,5—2 ч. Показатель готовности прибора к работе — четкая нулевая линия на самописце. Исходные данные прибора: скорость движения азота 40 мл/мин (определяют пеноизмерителем); скорость движения водорода 40 мл/мин, воздуха — 400 мл/мин. Рабочая температура камеры введения исследуемой пробы составляет 170 °С, камеры с колонкой и детектором 210 °С.

Порядок включения и работы прибора. Открывают баллон с азотом. Включают «Хром-5», генератор водорода и компрессор. После этого выставляют на приборе необходимые параметры работы: скорость движения азота, водорода и воздуха. Выставляют температурный режим: камера введения пробы 170 °С, камера с колонкой и детектором 210 °С, поджигают водород и включают кнопку «Нагрев». Далее устанавливают карандаш и включают самописец. На протяжении 1,5—2 ч прибор прогревают при постоянном контроле температурного режима и самописца. Если через 2 ч самописец вычерчивает четкую нулевую (горизонтальную) линию, это значит, что прибор готов к работе. Затем в микрошприц набирают 3 мкл исследуемой пробы и вводят в камеру ввода, на самописце фиксируется полученный результат.

На протяжении всей работы прибора необходимо контролировать температурный режим.

Подсчет полученных результатов. С помощью миллиметровой линейки рассчитывают площадь каждой кислоты в отдельно взятой пробе и в стандартной смеси. Для этого измеряют высоту пика и умножают на ширину пика на середине высоты. Полученные результаты по каждой кислоте суммируют и подсчитывают общую площадь каждой пробы. Например, высота пика уксусной кислоты 40 мм, ширина на середине высоты 6 мм, площадь в этом случае составит $40 \cdot 6 = 240$ мм^2. Таким образом подсчитывают площади всех имеющихся кислот.

Расчет. Сумма площадей всех кислот 100 %, а площадь отдельно взятой кислоты x. После проведения необходимых математи

ческих расчетов получают процентное содержание отдельно взятой кислоты. Например, общая площадь всех кислот 560 мм^2, а площадь уксусной кислоты 240 мм^2. Составляем пропорцию:

560 мм^2 — 100%

240 мм^2 — x,

$$x = \frac{240 \cdot 100}{560} = 42{,}85\%.$$

Умножив полученный результат на поправочный коэффициент для уксусной кислоты, который равен 1,125, узнаем относительное содержание уксусной кислоты: 42,85 · 1,125 = 48,2 %.

Определение поправочных коэффициентов. С помощью микрошприца вводят 3 мкл стандарта в камеру ввода и записывают показатели на самописце. Подсчитывают полученные результаты и определяют поправочный коэффициент.

Например, в стандартной смеси содержится уксусной кислоты 60%, пропионовой 20, масляной 15, изовалериановой 2 и валериановой кислоты 3 %. Проведя подсчеты хроматограмм, получают следующие показатели: уксусной кислоты 52 %, пропионовой 18, масляной 23, изовалериановой 2,9 и валериановой кислоты 4,1 %.

Подсчитывают поправочный коэффициент для уксусной кислоты (60 : 52 = 1,153) и таким же способом для всех других кислот: пропионовой (20 : 18 = 1,1), масляной (15 : 23 = 0,652), изовалериановой (2 : 2,3 = 0,689) и валериановой (3 : 3,1 = 9,731).

Примечание. Для постоянного контроля работы прибора смесь стандартных кислот необходимо вводить перед началом исследований, а затем через каждые 8—10 проб.

Клиническое значение. Конечный продукт ферментации углеводов — ЛЖК. Среди них содержание уксусной, пропионовой и масляной кислот составляет около 95 %. Остальное количество приходится на валериановую, изовалериановую, изомасляную и капроновую кислоты. По данным А. В. Чуба (2002), в содержимом рубца клинически здоровых высокопродуктивных коров содержится 45—55 % (52 ± 1,3) уксусной, 20—30 (27 ± 1,12) пропионовой, 15—20% (22 ± 1,33) масляной, 2,0 ± 0,4 % изовалериановой и 2,8 ± 0,6 % валериановой кислот. В. В. Влизло (1998) выявил в содержимом рубца незначительное количество изомасляной кислоты.

Увеличение в рационе жвачных клетчатки приводит к возрастанию синтеза уксусной кислоты, крахмала — пропионовой, сахара — молочной, затем пропионовой кислоты. Уменьшается концентрация уксусной кислоты при низком содержании сена в рационе, а также у больных кетозом, гепатодистрофией коров и при смещении сычуга. Относительно увеличивается количество масляной кислоты при кетозе (в 1,4 раза), поэтому соотношение между про-

пионовой и масляной кислотами уменьшается у больных до 1,04 ± ± 0,08 по сравнению с 1,37 ± 0,09 у здоровых (А. В. Чуб, 2002).

При вторичной дистонии рубца увеличивается содержание изовалериановой и валериановой кислот. Особенно возрастает их концентрация при смещении сычуга (4,2 ± 0,1 и 7,2 ± 0,9 % соответственно). Вероятно, это объясняется тем, что при снижении в рационе клетчатки бактерии рубца потребуют для своего роста добавки валериановой, изовалериановой и изомасляной кислот (В. Г. Янович, Л. И. Сологуб, 2000).

6.5. ЭКСПРЕСС-МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРОФЛОРЫ РУБЦА

Проба с метиленовым синим (по G. Dirksen). Принцип. Красящее вещество — метиленовый синий, введенное в содержимое рубца (in vitro), обесцвечивается, восстанавливаясь ферментами микроорганизмов.

Реактив: 0,03%-ный раствор метиленового синего.

Оборудование: водяная баня; пробирки или химические стаканчики; стеклянные палочки; секундомер или часы.

Ход определения. В пробирку или химический стаканчик на 20 мл наливают 10 мл свежевзятого содержимого рубца, приливают 0,5 мл (в стаканчик 1 мл) 0,03%-ного раствора метиленового синего и перемешивают стеклянной палочкой. Параллельно ставят контрольную пробу без добавления метиленового синего. Пробирки (стаканчики) перемещают на водяную баню при температуре 38 °С и контролируют время обесцвечивания красящего вещества, сравнивая опытную пробу с контрольной.

У здорового крупного рогатого скота при смешанном типе кормления обесцвечивание наступает за 3 мин. Если же обесцвечивание продолжается 15—17 мин, необходимо обратить внимание на кормление животных (качество корма и режим кормления). Увеличение времени обесцвечивания раствора метиленового синего до 30 мин и более свидетельствует о заболевании преджелудков.

Проба со сбраживанием глюкозы. Принцип. Легкоперевариимые углеводы, поступающие с кормом в рубец, активно ферментируются микрофлорой до ЛЖК и газов (углекислый, метан, водород). Добавляя глюкозу к содержимому рубца (in vitro), фиксируют активность газообразования и таким образом делают выводы о ферментативной способности микроорганизмов.

Реактив: свежеприготовленный 16%-ный раствор глюкозы.

Оборудование: сахарометр или градуированные пробирки; термостат.

Ход определения. В сахарометре или градуированной пробирке смешивают 10 мл свежего содержимого рубца с 0,5 мл 16%-ного слегка подогретого раствора глюкозы и ставят в термостат при темпе-

ратуре 38 °С. Интенсивность ферментации глюкозы определяют через 30 и 60 мин по величине образованной прослойки газов.

В содержимом рубца здорового крупного рогатого скота при сбраживании глюкозы газовая прослойка толщиной 1 см образуется в течение 30 мин, а через 60 мин она достигает 2 см. При инактивации микрофлоры (ацидоз, алкалоз) количество образовавшихся газов незначительно или их нет совсем. При тимпании рубца газообразование значительно возрастает.

Проба с восстановлением нитратов. Принцип. Внесение калия нитрата в содержимое рубца (in vitro) вызывает его восстановление микроорганизмами и использование азота, характеризующееся исчезновением красного цвета.

Реактивы: 0,025%-ный раствор калия нитрата (KNO_3);

реактив 1: 2,0 мл концентрированной серной кислоты смешивают с 200 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты;

реактив 2: 0,6 мл α-нафтилина, 16,0 мл концентрированной уксусной кислоты смешивают со 140 мл дистиллированной воды.

Оборудование: водяная баня; пробирки; пластина с ячейками.

Ход определения. В 3 пробирки наливают по 10 мл содержимого рубца. В первую пробирку вносят 0,2 мл, во вторую 0,5 мл и при необходимости в третью 0,7 мл 0,025%-ного раствора калия нитрата. Пробирки ставят в водяную баню при температуре 39 °С. Через 5 мин из каждой пробирки берут по 1 капле смеси и наносят на пластинку с ячейками. Затем добавляют по 2 капли реактивов 1 и 2. Если восстановление нитратов не наступило, то смесь окрашивается в красный цвет. В случае расщепления калия нитрата микрофлорой в течение 5 мин окрашивание не появляется. При появлении красного цвета продолжают контролировать время обесцвечивания поминутно.

В содержимом рубца здоровых животных KNO_3 восстанавливается через 5—10 мин в первой пробирке и через 20 и 30 мин соответственно во второй и третьей. При нарушении ферментативной активности микрофлоры (ацидоз, алкалоз, атонии, гипотонии) время восстановления затягивается или же восстановления вообще не происходит.

Определение целлюлолитической активности микрофлоры. Расщепление грубого корма у жвачных происходит ферментами целлюлолитических микроорганизмов, которые заселяют рубец во время поедания первых порций сена (примерно в двухнедельном возрасте). Уже в 2—3-месячном возрасте отмечают максимальную целлюлолитическую активность микроорганизмов. Расщепление клетчатки приводит к образованию ЛЖК — источника энергии животных. В преджелудках усваивается 60—70 % клетчатки.

Принцип базируется на способности целлюлолитической микрофлоры переваривать хлопчатобумажную нить (in vitro).

Реактив: 16%-ный раствор глюкозы.

Оборудование: термостат; пробирки; стеклянный шарик; натуральная хлопчатобумажная нить № 10 (искусственную или полусинтетическую не используют).

Ход определения. В пробирке смешивают 10 мл свежевзятого содержимого рубца и 0,3 мл 16%-ного раствора глюкозы. К концу хлопчатобумажной нити привязывают стеклянный шарик и опускают на дно пробирки с содержимым рубца. Противоположный конец нити фиксируют вокруг внешнего края пробирки. Пробу помещают в термостат при 39 °С и через 12 ч проводят первый контроль. Содержимое рубца переваривает нить в течение 96 ч. Если за это время переваривание не произошло, целлюлолитическая активность считается отрицательной.

Определение амилолитической активности содержимого рубца. Определение амилолитической активности содержимого рубца базируется на принципе расщепления крахмала микробной амилазой; фотоэлектроколориметрический анализ проводится по цветной реакции крахмала и йода.

Реактивы: 6,25%-ный раствор крахмала (готовится непосредственно перед использованием). В колбочку на 250 мл отвешивают 6,25 г водорастворимого крахмала и доливают 80 мл дистиллированной воды. После образования суспензии крахмала колбочку 10 мин выдерживают в кипящей водяной бане (до полного растворения крахмала), часто встряхивая. Раствор крахмала, охлажденный до комнатной температуры, переносят в мерную колбочку на 100 мл и доводят объем кипяченой дистиллированной водой до метки;

фосфатный буфер, pH 6,8;

2 н. раствор хлористоводородной кислоты (HCl);

раствор калия йод-йодистого. Растворяют 20 г калия йодида и 2 г кристаллического йода в 1 л дистиллированной воды.

Оборудование: фотоэлектроколориметр; водяная баня; мерные колбы на 50 мл.

Ход определения. В пробирке смешивают 1,6 мл 6,25%-ного раствора крахмального субстрата с 7,4 мл фосфатного буфера. После 10-минутного нагревания пробирки в водяной бане при 40 °С добавляют 1 мл жидкости рубца, процеженной через 2 слоя марли. Содержимое пробирки тщательно взбалтывают и сразу же пипеткой переносят 0,5 мл этой жидкости в мерную колбу на 50 мл с 2 мл 2 н. раствора HCl для прекращения действия микробных ферментов. В колбу добавляют 2 мл раствора калия йод-йодистого и дистиллированной водой доводят объем до 50 мл (проба до инкубации). После этого пробирку выдерживают 1 ч в водяной бане при температуре 40 °С, периодически (через 10—15 мин) перемешивая содержимое пробирки встряхиванием. По завершении инкубации из пробирки отбирают пробу 0,5 мл и переносят в мерную колбочку на 50 мл с 2 мл 2 н. раствора HCl. Добавляют 2 мл калия йод-йодистого и дистиллированную воду до метки (проба после инкубации).

Полученные растворы проб до инкубации и через 1 ч после нее исследуют на ФЭКе в кюветах на 5 мм при красном светофильтре (620 нм) против дистиллированной воды.

Расчет. По калибровочной кривой определяют количество крахмала (мг) в растворах до инкубации и после нее. Разница между этими показателями дает количество крахмала, расщепленного микробной амилазой за 1 ч инкубации. Амилолитическая активность выражается формулой

$$x = (A - B) \cdot 20,$$

где x — количество крахмала, расщепленного 1 мл содержимого рубца за 1 ч, мг; A — количество крахмала в растворе до инкубации, мг; B — количество крахмала после инкубации, мг; 20 — коэффициент перерасчета на 1 мл содержимого рубца.

Определение активности α-амилазы. Принцип. Определяют количество редуцирующих сахаров, которые образуются вследствие ферментативного расщепления крахмала. В основу метода положена цветная реакция с 3,5-динитросалициловой кислотой, которая в щелочной среде при наличии редуцирующих сахаров превращается в 3-амино-5-нитросалициловую кислоту и образует раствор желто-померанцевого цвета.

Реактивы: раствор 3,5-динитросалициловой кислоты. 1 г 3,5-динитросалициловой кислоты и 30 г сегнетовой соли растворяют в 20 мл 2 н. раствора NaOH и доводят объем до 100 мл;

2 н. раствор NaOH;

калий-натрий виннокислый (сегнетовая соль);

мальтоза (для приготовления стандартного раствора);

1/15 М раствор натрия хлорида;

1%-ный раствор крахмала (субстрат).

Оборудование: фотоколориметр.

Ход определения. Жидкость рубца разводят дистиллированной водой в соотношении 1:5. В опытную пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора крахмала и ставят в водяную баню при 39 °С на 1—2 мин. Добавляют 1 мл разведенного содержимого рубца, инкубируют 20 мин. Добавляют 2 мл 3,5-динитросалициловой кислоты для прекращения реакции. В контрольную пробирку набирают 2 мл раствора 3,5-динитросалициловой кислоты, 1 мл разведенного содержимого рубца, а затем 1 мл 1%-ного раствора крахмала и перемешивают. Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню на 5 мин, немедленно охлаждают в проточной воде и фотометрируют при 530 нм.

Активность α-амилазы высчитывают по разнице показателей ФЭК между опытными и контрольными пробами, а затем по калибровочному графику определяют количество мальтозы, которая освободилась вследствие ферментативной реакции, по формуле

$$E = \frac{AP}{20},$$

где E — число единиц активности α-амилазы, выраженное в мг мальтозы; A — количество мальтозы, определенное по графику; P — величина разведения химуса (в 5 раз); 20 — время инкубации, мин.

Если параметры выдержаны, то $E = \frac{A \cdot 5}{20} = \frac{A}{4}$.

Примечание. Необходимо отработать кинетику фермента, т. е. продолжительность инкубации.

Определение протеиназной активности содержимого рубца. Принцип. При pH больше 5,0 α-аминокислоты реагируют с нингидрином с образованием углекислоты, альдегида и соединения, окрашенного в синий цвет, которое характеризуется максимальным поглощением при длине волны 597 нм. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству аминокислот.

Реактивы: фосфатный буфер, pH 7,1;

цитратный буфер, pH 5,4;

2%-ный раствор казеина, приготовленный на 0,5%-ном растворе Na_2CO_3;

0,5%-ный раствор натрия карбоната;

10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты;

0,01 н. раствор кислоты хлористоводородной (HCl);

60%-ный раствор глицерина;

1%-ный раствор нингидрина (растворяют при подогревании в цитратном буфере; реактив темного цвета необходимо очищать);

раствор «С»: к 40 мл 60%-ного глицерина добавляют 100 мл 1%-нингидрина и 40 мл цитратного буфера (готовят перед анализом).

Ход определения. В одну пробирку (опыт) вносят 4 мл раствора казеина, 1 мл фосфатного буфера и помещают в водяную баню при температуре 30 °С. Через 10 мин добавляют 1 мл разведенного в 5 раз дистиллированной водой содержимого рубца (1 + + 4), смешанного и инкубированного при 30 °С в течение 60 мин. Добавляют 4 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для прекращения реакции. Взбалтывают 10 мин, центрифугируют или фильтруют (фильтрат должен быть прозрачным).

Набирают 0,2 мл фильтрата или аликвота, добавляют 3,8 мл раствора «С», пробирки закрывают притертыми стеклянными пробками и ставят в кипящую водяную баню на 20 мин.

Пробы, окрашенные в синий цвет, охлаждают в проточной воде и фотометрируют через 10—15 мин на приборе с красным светофильтром в кювете на 10 мм. Интенсивность окраски сохраняется в течение 1 ч.

В контрольную пробирку вносят 1 мл разведенного содержимого рубца, 1 мл фосфатного буфера, 4 мл трихлоруксусной кислоты, выдерживают 10 мин в водяной бане при температуре 30°С. После этого вносят 4 мл раствора казеина, смешивают и фильтруют. Затем исследуют так же, как опытную пробу.

Количество свободного аминного азота определяют по калибровочному графику. Для его построения берут стандартные растворы тирозина или глицина и готовят ряд растворов, которые содержат различное количество этих аминокислот (мкмоль), и дальше реакцию проводят так же, как описано выше. Активность фермента выражают в микромолях аминного азота глицина или тирозина за 1 мин на 1 г ферментного препарата (содержимого рубца), что соответствует 1 ед. активности:

$$x = \frac{A \cdot Б}{B},$$

где x — активность фермента, мкмоль/л; A — показатель стандартного графика; $Б$ — степень разведения (в 5 раз); B — время инкубации (60 мин).

Источник: 1.

Определение липолитической активности содержимого рубца. Принцип. Содержимое инкубируют с приготовленной эмульсией подсолнечного масла. Показателем активности ферментов является количество освобожденных свободных жирных кислот.

Реактивы: подсолнечное масло;

0,6%-ный раствор цистеина солянокислого или аскорбиновой кислоты;

желчь;

20%-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты;

0,01 н. раствор NaOH;

раствор Рингера—Локка: 9 г NaCl, 0,2 г $NaHCO_3$, 0,2 г $CaCl_2$, 0,2 г KCl, 1 г глюкозы и воды дистиллированной до 1 л;

индикатор Таширо: 40 мл 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного и 10 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленового синего.

Оборудование: термостат; холодильник; бюретка; колбочки на 100 мл с притертыми пробками.

Ход определения. Содержимое рубца хорошо перемешивают и готовят разведение 1:10. Готовят субстратную смесь: 3 мл подсолнечного масла, 3 мл раствора Рингера—Локка, 1 мл 0,6%-ного раствора цистеина солянокислого и 3 капли желчи.

В колбочки на 100 мл (2 опытные и 2 контрольные) с притертыми пробками набирают по 3 мл раствора Рингера—Локка и 1 мл содержимого рубца. Опытные пробы ставят в термостат при температуре 39 °С на 5 ч, контрольные — в холодильник. Через каждый час пробы встряхивают 5 мин. Через 5 ч добавляют в колбочки по 3 капли 20%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты и опытные пробы помещают в холодильник. Содержимое колбочек фильтруют в пробирки, добавляют по 1 капле индикатора Таширо. Опытные и контрольные пробы тестируют 0,01 н. раствором NaOH до розового цвета.

Расчет липолитической активности содержимого рубца (ЛА) ведут по формуле

$$x = \frac{A - Б}{5},$$

где x — липолитическая активность, ед. за 1 ч инкубации; A — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытных проб, мл; $Б$ — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольных проб, мл; 5 — время инкубации, ч.

6.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Общую кислотность содержимого рубца определяют подобно кислотности содержимого желудка или сычуга.

Принцип. К содержимому рубца в присутствии индикатора прититровывают раствор щелочи, что вызывает смену цвета.

Реактивы: 0,1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина. 1 г фенолфталеина вносят в колбочку на 100 мл и растворяют 96%-ным этиловым спиртом. Готовый реактив хранят при комнатной температуре;

0,1 н. раствор натрия гидроксида (NaOH). Готовят из фиксанала, перед применением его титр проверяют 0,1 н. раствором кислоты хлористоводородной (HCl).

Оборудование: микробюретки на 2 и 5 мл; колбы на 50 и 100 мл; стаканчики или конические колбочки; пипетки на 5 и 10 мл; капельница.

Ход определения. В стаканчик или коническую колбочку наливают 10 мл профильтрованного содержимого рубца и добавляют из капельницы 1—2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина. В кислом растворе индикатор не изменяет цвета. При титровании из микробюретки 0,1 н. раствором натрия гидроксида цвет изменяется до розово-красного. Общая кислотность содержимого рубца определяется количеством миллилитров 0,1 н. раствора натрия гидроксида, необходимого для титрования 1 л (1000 мл) содержимого рубца (ед. титра). 1 ед. титра (ЕТ) соответствует концентрации кислот в 1 ммоль/л.

Расчет общей кислотности ведут по формуле

$$x = \frac{A \cdot 1000 \cdot 0{,}1}{C},$$

где x — общая кислотность, ммоль/л (ЕТ); A — количество 0,1 н. раствора NaOH, мл; 1000 — пересчет на 1 л; 0,1 — количество миллиграмм-эквивалентов щелочи в 1 мл 0,1 н. раствора, ммоль; C — объем содержимого рубца, взятого для исследования, мл.

У клинически здоровых коров с нормальной ферментацией содержимого общая кислотность составляет 8—25 ммоль/л (ЕТ). В гиперацидном состоянии (ацидоз, непроходимость сычуга, антиперистальтика) общая кислотность возрастает до 70 моль/л (ЕТ).

6.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТИСТЫХ ВЕЩЕСТВ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

Определение общего азота в жидкости рубца. Для определения концентрации общего азота в рубцовой жидкости используют метод Кьельдаля.

Принцип. Метод базируется на способности органических соединений под воздействием кипящей серной кислоты окисляться до углекислоты и воды. Азот белковых и близких к ним соединений при этом гидролизируется, образуя в присутствии воды ионы аммония. Метод выполняют в три этапа: минерализации (сжигания) пробы, отгонки аммиака и его определения.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4;

33%-ный раствор NaOH;

0,01 н. (0,01 моль/л) раствор NaOH;

0,01 н. (0,005 моль/л) H_2SO_4;

индикатор Таширо;

катализатор, состоящий из K_2SO_4 (Na_2SO_4), меди сульфата и селена в соотношении 100:10:5.

Оборудование: колбы Кьельдаля на 100 мл; плитка для сжигания образцов; прибор Кьельдаля для перегонки пробы; пипетки; бюретки на 10 мл; индикаторная бумага.

Ход определения. В колбу Кьельдаля осторожно наливают 1 мл рубцового содержимого. Туда же приливают 5 мл H_2SO_4 (концентрированной) и 1 г катализатора. Колбы ставят под углом сначала на слабое, а потом на сильное пламя, не доводя до сильного кипения. Сжигание прекращают, когда жидкость в колбе станет прозрачной.

В перегонную колбу переносят всю сожженную пробу. В приемную колбочку наливают 10—20 мл 0,01 н. раствора серной кислоты и 3—4 капли индикатора Таширо, подставляют ее под стеклянную трубочку, соединенную с холодильником аппарата Кьельдаля, опуская конец трубки в раствор кислоты.

Отмеривают 30—40 мл 33%-ного раствора NaOH и заливают его через воронку в перегонную колбу. Включают нагреватель и начинают отгонять пробы. Во время кипячения выделяется аммиак, который вместе с парами воды после прохождения через холодильник попадает в приемник и связывается с серной кислотой. Отгонку продолжают 15—30 мин до нейтральной реакции, проверяя индикаторной бумагой.

Содержимое приемной колбы титруют 0,01 н. раствором NaOH до изменения малинового цвета на зеленый.

Расчет количества общего азота в пробе ведут по формуле

$$x = (A - Б) \cdot 0{,}14 \cdot 100,$$

где x — количество общего азота в 100 мл рубцовой жидкости, мг; A — количество 0,01 н. раствора H_2SO_4 в приемнике, мл; $Б$ — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл; 0,14 — количество азота, связываемое 1 мл 0,01 н. раствора серной кислоты, мг.

Расхождение результатов параллельных определений не должно превышать 2—3 %.

Концентрация общего азота, который представлен белком микроорганизмов, нерасщепившимся протеином корма, конечными и промежуточными продуктами азотистого обмена (аммиак, свободные аминокислоты, пептиды и др.), в цельном содержимом рубца коров может составлять 100—300 мг/100 мл, в рубцовой жидкости — от 50 до 240 мг/100 мл, у овец — 120—350 и 60—250 мг/100 мл соответственно.

Источники: 25, 29.

Определение белкового и небелкового (остаточного) азота в жидкости рубца. *Определение небелкового азота.* Небелковый азот в рубцовой жидкости определяют методом Кьельдаля. Предварительно необходимо осадить белки. С этой целью используют соли тяжелых металлов, поскольку трихлоруксусная кислота недостаточно полно осаждает растительные белки и полипептиды.

Реактивы: 0,3 н. (0,15 моль/л) раствор $Ba(OH)_2$;

5%-ный $ZnSO_4$;

фенолфталеин (индикатор);

остальные реактивы те же, что и при определении общего азота.

Оборудование: центрифуга; колбы Кьельдаля на 100 мл; прибор Кьельдаля для перегонки пробы; пипетки, бюретки; электроплитка.

Ход определения. Для осаждения белков в центрифужную пробирку наливают рубцовую жидкость определенного объема (например, 2 мл). Туда же добавляют такое же количество 0,3 н. раствора $Ba(OH)_2$ и аналогичный объем 5%-ного раствора цинка сульфата. Реактивы предварительно должны быть оттитрованы, т. е. должны точно нейтрализовать друг друга по фенолфталеину (объем на объем). Смесь тщательно перемешивают и центрифугируют 15 мин при 3000—5000 $мин^{-1}$. 3 мл центрифугата, соответствующего 1 мл рубцовой жидкости, переносят в колбу Кьельдаля, заливают 3 мл концентрированной серной кислоты. Сжигание пробы и отгонку аммиака проводят так же, как и при определении общего азота. Учитывая, что концентрация небелкового азота в содержимом рубца не превышает 60 мг/100 мл, в приемную колбу достаточно налить 10 мл 0,01 н. раствора серной кислоты.

Расчет содержания небелкового азота, как и общего азота, ведут по формуле

$$x = (A - Б) \cdot 0{,}14 \cdot 100,$$

где x — концентрация небелкового азота, мг/100 мл; A — количество 0,01 н. раствора H_2SO_4 в приемнике, мл; $Б$ — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование, мл.

Определение белкового азота. Белковый азот определяют по разнице общего и небелкового азота.

Количество небелкового азота в рубцовой жидкости крупного рогатого скота составляет 15—60 мг/100 мл, овец — 10—50 мл/100 мл, небелкового соответственно 35—200 и 40—240 мг/100 мл.

Определение аммиака (аммонийного азота) с реактивом Несслера. Реактивы: реактив Несслера; аммония сульфат.

Оборудование: спектрофотометр или фотоэлектроколориметр; центрифуга.

Ход определения. Микропипеткой отбирают 20 мкл отцентрифугированной жидкости рубца, переносят в пробирки, в которые предварительно набирают по 5 мл дистиллированной воды, перемешивают. Добавляют по 0,2 мл реактива Несслера и вновь перемешивают. Пробы, в которых цвет стал желтым, через 10 мин спектрофотометрируют при длине волны 410 нм. Оптическую плотность измеряют против контрольной пробы, в которую входят те же ингредиенты, но вместо рубцовой жидкости 20 мкл дистиллированной воды. Таким же образом обрабатывают 20 мкл стандартного раствора, используя с этой целью аммония сульфат. Готовят его из расчета 0,4716 г перекристаллизованного $(NH_4)_2SO_4$ на 1 л бидистиллированной воды. В 1 мл такого раствора содержится 100 мкг азота (в 20 мкл — 2 мкг).

Расчет количества аммиака в жидкости рубца ведут по формуле

$$x = E_п A / E_с,$$

где x — количество аммиака в пробе, мкг; $E_п$ — экстинкция пробы; A — количество аммиака в стандартном растворе, мл; $E_с$ — экстинкция стандарта.

Источник: 53.

Определение аммиака микродиффузионным методом. Принцип. Метод заключается в вытеснении аммиака из аммонийных солей концентрированным раствором щелочи с последующим поглощением его титрованным раствором кислоты.

Реактивы: 0,02 н. (0,01 моль/л) раствор серной кислоты;

насыщенный раствор K_2CO_3;

0,01 н. (0,01 моль/л) раствор натрия гидроксида;

индикатор Таширо. Готовят два раствора: 1) 50 мг метиленового синего растворяют в 50 мл спирта; 2) 100 мг метиленового красного (метилрота) растворяют в 50 мл спирта. Затем оба раствора соединяют в равных объемах.

Оборудование: чашки Конвея; пипетки; бюретки на 2 мл.

Ход определения. Предварительно подготавливают чашку Конвея, наружный верхний край ее смазывают вазелином. Во внутреннюю камеру чашки Конвея заливают точно отмеренное количество 0,02 н. раствора серной кислоты. Исходя из предполагаемого уровня аммиака в пробе объем раствора может быть 2 или 1 мл. Туда же добавляют 3—4 капли индикатора Таширо. В наружную камеру чашки Конвея наливают 1 мл рубцовой жидкости и чашку закрывают крышкой. Затем, чуть приоткрыв крышку, в на-

ружную камеру осторожно с противоположной стороны от налитой рубцовой жидкости вливают 2 мл насыщенного раствора K_2CO_3. Крышку быстро закрывают, проверяют герметичность камеры и осторожно смешивают исследуемую жидкость со щелочью.

Параллельно с опытными ставят контрольную («слепую») пробу, при этом в наружную камеру чашки вместо рубцовой жидкости наливают 1 мл дистиллированной воды. Остальные манипуляции такие же, как и с опытной пробой.

Затем чашки с опытными пробами и контрольную ставят на время, необходимое для полного вытеснения из анализируемого раствора аммиака и последующего поглощения его раствором серной кислоты. Обычно диффузия при комнатной температуре продолжается не менее 12 ч. Однако чаще всего ее проводят 20—24 ч. По окончании этого срока избыток кислоты оттитровывают 0,01 н. раствором натрия гидроксида до перехода малиновой окраски в зеленую.

Расчет ведут по формуле

$$x = (A - Б) \cdot 0{,}17 \cdot 100,$$

где x — количество аммиака в 100 мл жидкости, мг; A — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование контрольной пробы, мл; $Б$ — количество 0,01 н. раствора NaOH, пошедшего на титрование опытной пробы, мл; 0,17 — количество аммиака, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора NaOH или 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4, мл; 100 — коэффициент для перевода в мг/100 мл.

Следует отметить, что данный метод анализа позволяет улавливать не только свободный газообразный аммиак, но и аммиак рубцового содержимого, находящийся в связанном состоянии в виде аммония. Поэтому лучше рассчитывать содержание в рубцовой жидкости азота аммиака или аммонийного азота по формуле

$$x = (A - Б) \cdot 0{,}14 \cdot 100,$$

где 0,14 — количество аммонийного азота, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора NaOH или 1 мл 0,01 н. раствора H_2SO_4, мл.

Пример: на титрование контрольной пробы пошло 4 мл 0,01 н. раствора NaOH; на титрование опытной пробы — 2,24 мл 0,01 н. раствора NaOH; $x = (4{,}00 - 2{,}24) \cdot 0{,}14 \cdot 100 = 24{,}64$ мг/100 мл. Следовательно, в 100 мл рубцовой жидкости содержится 24,64 мг азота аммиака или аммонийного азота.

Клиническое значение. Аммиак — конечный продукт превращения белковых и небелковых веществ корма. Количество его, образующееся в рубце, зависит в первую очередь от количества белка, соотношения легко- и тяжелорастворимого протеина в кормах рациона, азотсодержащих небелковых соединений, а также от интенсивности его использования при синтезе микробного белка и всасывания в кровь. При обычных условиях кормления концентрация аммиака может составлять от 5 до 40 мг/100 мл (2,8—22 ммоль/л), но оптимальное количество 6,5—25 мг/100 мл.

Скорость образования аммиака и его концентрация в содержимом рубца определяются обеспеченностью рационов энергией и использованием аммиака рубцовой микрофлорой для синтеза белка. Установлено, что максимальная скорость синтеза белка микроорганизмами бывает при концентрации аммонийного азота в рубце в пределах от 5 до 20 мг/100 мл (от 2,8 до 11,0 ммоль/л). При концентрации выше 50 мг/100 мл (27,5 ммоль/л) аммиак начинает интенсивно всасываться в кровь. Бóльшая часть его в печени превращается в мочевину (орнитиновый цикл), некоторое количество мочевины синтезируется из аммиака в почках (цикл Кребса—Генселяйта).

Увеличение образования аммиака в рубце наблюдается при нарушении соотношения в кормах рациона между легко- и труднорастворимым протеином (оптимальным является 50—60 % легкорастворимого протеина в начале лактации и 65—70 % в средней и последней трети лактации); при скармливании зеленой массы люцерны, клевера, озимой ржи; при повышенном уровне нитратов в кормах; использовании углеаммонийных солей, аммиачной воды; скармливании некачественного силоса и сенажа, в которых содержание аммонийного азота может составлять 35—50 % общего азота. Кроме того, в этих случаях pH содержимого рубца смещается в щелочную сторону, что увеличивает скорость всасывания аммиака в кровь.

Обезвреживание аммиака нарушается при патологии печени (гепатит, цирроз, гепатодистрофия) вследствие уменьшения синтеза мочевины. Количество его в крови увеличивается (*гипераммониемия*): в артериальной до 20—129 мкмоль/л, в венозной до 12—85 мкмоль/л (у здоровых коров 7,0—30,0 и 5,5—25 соответственно). Аммиак легко проникает через гематоэнцефалический барьер и его количество в ликворе может составить 40—64 мкмоль/л против 8,5 мкмоль/л у здоровых коров (В. В. Влизло, 1998). Соли аммония резко угнетают обмен ацетилхолина, и у животных развивается печеночная энцефалопатия и печеночная кома.

Накапливающийся в тканях аммиак блокирует цикл Кребса, что неминуемо ведет к нарушению окислительно-восстановительных процессов в организме, т. е. к состоянию гипоксии. Угнетение тканевого дыхания имеет следствием нарушение синтеза макроэргических соединений (АТФ, КФ). Полагают, что это может быть связано с блокированием α-кетоглутаровой кислоты вследствие активирования процесса восстановительного аминирования или угнетения активности ферментов, участвующих в окислительном декарбоксилировании α-кетокислот (В. С. Калашников, 2000). Влияние аммонийного азота на организм моногастричных животных значительно сильнее вследствие отсутствия у них гепаторенальной системы обмена азота.

6.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРИТОВ В ЖИДКОСТИ РУБЦА

Принцип. Метод базируется на реакции Грисса, по которой при взаимодействии реактива Грисса с ионами NO_2 образуется окрашенный раствор; интенсивность окраски зависит от концентрации нитритов.

Реактивы: 0,3 н. раствор $Ba(OH)_2$;
5%-ный раствор цинка сульфата;
фенолфталеин (индикатор);
5%-ный раствор аммиака;
0,1 н. раствор кислоты хлористоводородной (HCl);
96%-ный этиловый спирт;
сульфаниловая кислота;
α-нафтиламин;
12%-ный раствор кислоты уксусной;
реактив Грисса. Состоит из равных объемов двух растворов; а) 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты; б) смешивают 180 мл 12%-ного раствора уксусной кислоты с фильтратом водного раствора α-нафтиламина, полученного при кипячении 0,2 г последнего в 20 мл дистиллированной воды. Хранят раствор в темном месте, а перед употреблением готовят необходимое количество раствора Грисса.

Оборудование: фотоэлектроколориметр или спектрофотометр; мерные колбочки на 100 мл.

Ход определения. Предварительно важно приготовить осадители. Оба раствора [0,3 н. $Ba(OH)_2$ и 5%-ный раствор $ZnSO_4$] должны точно нейтрализовать друг друга по фенолфталеину (объем на объем). Затем осаждают белки рубцовой жидкости. Для этого в пробирки наливают по 2 мл рубцовой жидкости, добавляют такой же объем бария гидроксида и цинка сульфата. Смесь тщательно смешивают и центрифугируют 15 мин при 3000—5000 $мин^{-1}$.

20 мл полученного центрифугата переносят в мерную колбу на 100 мл, куда последовательно добавляют 5 мл 5%-ного раствора аммиака, 10 мл 0,1 н. раствора кислоты хлористоводородной и доводят объем до метки дистиллированной водой. Из полученного раствора берут 15 мл и смешивают с 15 мл реактива Грисса. Через 15 мин определяют интенсивность окрашивания на электроколориметре при зеленом светофильтре в кювете на 20 мм. По показаниям экстинкции с помощью калибровочного графика вычисляют содержание нитритов в данном растворе.

Калибровочный график строят по стандартному раствору натрия нитрита ($NaNO_2$) с концентрацией нитрита от 0,1 до 1 мкг в 1 мл.

Расчет количества нитритов в 100 мл рубцовой жидкости ведут по формуле

$$x = E \cdot 1500,$$

где x — количество нитритов в 100 мл рубцовой жидкости, мкг; E — показатель количества нитритов в 1 мл, соответствующих полученной экстинкции; 1500 — произведение 15 · 100, где 15 — число, на которое умножают количество рубцовой жидкости, содержащейся в 20 мл безбелкового фильтрата, чтобы привести к 100 мл рубцовой жидкости; 100 — число, на которое необходимо умножить количество нитритов, найденное по калибровочному графику (E), чтобы определить, сколько нитритов содержится в 20 мл безбелкового фильтрата.

Если показатель экстинкции выше диапазона калибровочной кривой, полученный безбелковый фильтрат разводят определенным количеством дистиллированной воды и при расчетах учитываю степень разведения (P) фильтрата. Количество нитритов в этом случае определяют по формуле

$$x = E \cdot 1500 \cdot P.$$

6.9. МЕТОДЫ ПОДСЧЕТА МИКРООРГАНИЗМОВ В СОДЕРЖИМОМ РУБЦА

В рубце жвачных существует множество различных микроорганизмов — бактерий и простейших. Благодаря их активной деятельности питательные вещества корма подвергаются сложным превращениям, вследствие чего образуются ЛЖК, аммиак, аминокислоты, используемые организмом в процессе обмена. Наряду с превращением составных частей корма в соединения, доступные для усвоения в преджелудках, происходит синтез жизненно важных аминокислот, витаминов. Поступая в нижерасположенные отделы пищеварительного канала, бактерии и простейшие перевариваются и обеспечивают организм жвачных полноценными белками.

Росту и развитию большого количества разнообразной по составу микрофлоры и микрофауны способствуют определенные благоприятные условия среды в рубце, в том числе pH содержимого, постоянный ионный состав, непрерывное снабжение микроорганизмов питательной средой (кормом), анаэробные условия.

Бактерии и простейшие очень тесно реагируют на изменения кормления и содержания животных. Например, количество инфузорий увеличивается при добавке к рациону достаточного количества сена, углеводистых кормов. Если же в рационе преобладает силос, количество простейших уменьшается, изменяется их видовой состав. Летом при кормлении зелеными кормами их, как правило, становится больше по сравнению с зимним рационом. Почти полностью они исчезают при голодании, патологическом состоянии преджелудков, атонии, тимпании рубца, травматическом ретикулоперитоните.

Определение количества инфузорий. В рубце у жвачных находится примерно 100 видов инфузорий. Преимущественно они представлены классом Ciliata, в который входят две большие группы: подкласс Holotricha и подкласс Spirotricha. Инфузории первой группы равноресничатые (вся их поверхность равномерно покры-

та ресничками). Подкласс Spirotricha (малореснитчатые) в рубце составляет 60—80 % общего количества инфузорий.

Наличие в рубце большого количества инфузорий свидетельствует о нормальном и эффективном течении ферментативных процессов. Наиболее чувствительны к изменениям среды рубца большие инфузории. При неблагоприятных условиях существования в рубце они исчезают в первую очередь и появляются при нормализации процессов последними.

Видовой состав простейших определяют только в свежем содержимом рубца. Для этого каплю его наносят на предметное стекло, накрывают покровным стеклом и рассматривают по микроскопом вначале при малом (окуляр ×7, объектив ×10), затем при большом (окуляр ×7, объектив ×40) увеличении в слегка затемненном поле зрения. Поскольку инфузории, особенно большие, при комнатной температуре быстро теряют подвижность, то можно пользоваться столиком с подогревом (температура 38—39 °С). Для более детального определения строения инфузорий препарат лучше покрасить раствором Люголя или приготовить мазок и рассматривать его при большом увеличении или под иммерсией.

Реактив: 0,85%-ный раствор NaCl, слегка окрашенный метиленовым синим.

Оборудование: микроскоп; счетная камера с сеткой Горяева; лейкоцитарный меланжер.

Ход определения. В пробирку отбирают 5 мл профильтрованного содержимого рубца (жидкую часть) и добавляют 0,1 мл 4%-ного раствора формалина для фиксации инфузорий. Это позволяет подсчитывать количество инфузорий в течение 20—24 ч после взятия содержимого рубца. Содержимое пробирки тщательно перемешивают, набирают жидкость в лейкоцитарный смеситель (меланжер) до метки 1, а до метки 11 — изотонический раствор натрия хлорида, предварительно окрашенный раствором метиленового синего. Встряхивают 1—2 мин и получают разведение пробы в 10 раз.

В камеру с сеткой Горяева под покровное стекло вносят 1 каплю жидкости (первую каплю выдувают на вату). Инфузории подсчитывают в 100 больших квадратах. Общее количество инфузорий в 1 мм^3 (1 мкл) определяют по формуле

$$x = AC/nSh, \text{ т. е. } x = A \cdot 25,$$

где x — количество инфузорий в 1 мм^3 (1 мкл); A — количество подсчитанных инфузорий; C — разведение пробы; n — количество квадратов, в которых подсчитывали инфузории (100); S — площадь одного квадрата (1/25); h — высота камеры (0,1).

Количество инфузорий в 1 мл содержимого рубца определяют по формуле $x = A \cdot 1000$, ибо 1 мл = 1000 мкл.

В 1 мл жидкости рубца находится от 500 тыс. до 1,2 млн инфузорий. Количество их уменьшается при различных патологиях. Особенно мало инфузорий (70—100 тыс/мл) при смещении сычуга (А. В. Чуб, 2002).

Подсчет бактерий. Бактерии играют важную роль в процессах пищеварения жвачных животных. Они подвергают ферментному расщеплению целлюлозу (основной компонент грубых кормов), крахмал, моносахариды, кислоты (молочную, янтарную, муравьиную), липиды, принимают участие в превращении азотистых соединений. Наряду с основными видами существует ряд бактерий, которые не имеют функционального значения в рубцовом пищеварении, а попадают в рубец с кормом и водой.

Чисто рубцовые бактерии должны отвечать определенным требованиям: 1) выделенные из рубца микроорганизмы должны быть анаэробными; 2) бактерии должны присутствовать в рубце в количестве не менее чем 1 млн в 1 мл содержимого; 3) по 10 штаммов данного вида бактерий должно быть выделено не менее чем от двух животных; 4) культуры данного вида бактерий должны присутствовать в рубце животных различных географических зон; 5) конечные продукты обмена веществ полученных культур микроорганизмов должны быть типичными рубцовыми метаболитами.

В 1 мл рубцового содержимого присутствует 10^9—10^{10} бактерий.

Реактив: 0,85%-ный раствор NaCl.

Оборудование: микроскоп; микропипетки.

Ход определения. Содержимое рубца разводят стерильным изотоническим раствором натрия хлорида в соотношении 1:1000. Микропипеткой отбирают 0,01 мл этого разведения и профламбированной петлей размазывают его на предметном стекле на площади 1 $см^2$. Как правило, делают 3—4 мазка. Мазок высушивают над пламенем спиртовки и красят по Граму. Готовый мазок исследуют под иммерсией. Подсчитывают бактерии в определенном количестве типичных полей зрения. В связи с тем что мазок не всегда получается равномерным, поля зрения для подсчета необходимо брать по всему мазку, а лучше по диагонали. В каждом мазке подсчитывают не менее 10 полей зрения и выводят среднее значение для одного поля.

Чтобы определить общее количество бактерий всего мазка, уточняют площадь поля зрения микроскопа. Так как площадь круга составляет πr^2, то необходимо измерить диаметр поля (в мм) с помощью объект-микрометра. Площадь мазка 100 $мм^2$, деленная на площадь поля зрения под микроскопом, равна количеству полей зрения в мазке. Поскольку мазок приготовлен из 0,01 мл жидкости, то количество полей зрения в мазке, умноженное на 100, дает количество полей зрения в 1 мл рубцовой жидкости, разведенной до 10^3 (1:1000). Все эти арифметические подсчеты можно объединить формулой $10\,000 : 3{,}1417 \cdot r^2$, где 3,1417 — коэффици-

ент, на который следует умножить среднее количество клеток в поле зрения микроскопа.

Таким образом, подсчитав необходимое количество полей зрения (по 10 в трех мазках), суммируют общее количество бактерий и вычисляют среднее количество бактерий в одном поле зрения. Полученное число умножают на коэффициент и степень разведения. Коэффициент остается постоянным до тех пор, пока объектив, положение тубуса и окуляр микроскопа не меняются.

Пример. Определяем коэффициент. Диаметр поля зрения микроскопа 0,132 мм, соответственно его радиус — 0,066 мм, а r^2 составляет 0,004356:

$$\frac{10\,000}{3{,}1417 \cdot 0{,}004356} = \frac{10\,000}{0{,}0137}.$$

Подсчитав 30 полей зрения (по 10 в трех мазках), определили, что в поле зрения в среднем находится 15 микробных клеток.

Соответственно $\frac{15 \cdot 10\,000}{0{,}0137} \cdot 1000 = 10{,}9$ млрд $= 1{,}09 \cdot 10^{10}$ микробных клеток в 1 мл рубцовой жидкости.

6.10. НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА

Исследуя содержимое рубца, необходимо учитывать состав рациона, время взятия пробы после кормления и технику зондирования.

При кормлении грубоволокнистыми кормами состав содержимого рубца относительно постоянен в течение 1 ч после кормления. Введение в рацион богатых крахмалом комбикормов изменяет ферментативные процессы в рубце. В нем происходит интенсивное образование ЛЖК за счет пропионовой и масляной, появляется молочная кислота. Аналогичные изменения происходят при скармливании животным избыточного количества легкоусвояемых углеводов (сахарная и полусахарная свекла, патока), но в таком случае происходит образование молочной кислоты. Изменяется качественный и количественный состав микроорганизмов: уменьшается количество грамотрицательных бактерий, увеличивается количество грамположительных.

При анализе результатов исследований содержимого рубца следует учитывать время последнего кормления, поскольку в первые 2—3 ч после приема корма в преджелудках происходит активный гидролиз, что вызывает возрастание количества ЛЖК, аммиака, хлора, калия, соответственно величина водородного показателя (pH) и ионов натрия понижается. Позже, вследствие постепенного затухания ферментативных процессов в рубце и активного усвое-

ния продуктов гидролиза, происходит понижение концентрации ЛЖК (особенно пропионовой), аммиака, хлора, калия и повышение pH и содержания натрия. Поэтому при исследовании содержимого рубца пробы следует отбирать в одно и то же время после кормления. Вследствие зондирования животных для получения проб содержимого рубца раздражаются ротовая полость, глотка, кардиальный сфинктер, что вызывает усиленную саливацию. Известно, что слюна щелочной реакции (pH 8,7—9,2), поэтому ее примесь в содержимом рубца может стать причиной изменения pH и других показателей проб. Изменение pH в пробе с примесью слюны особенно показательно при ацидотическом состоянии рубца. Учитывая, что максимальное количество слюны поступает в пробу содержимого в начале зондирования, первые его порции (200 мл) для анализов использовать не следует.

ГЛАВА 7

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА КОРМОВ

Организация полноценного кормления сельскохозяйственных животных — важнейшее условие повышения их продуктивности и сохранения здоровья. Полноценное кормление достигается созданием крепкой кормовой базы, высоким качеством кормов и рациональным их использованием при кормлении животных.

Современная наука и передовая практика в области животноводства свидетельствуют о том, что наряду с хорошо организованным кормопроизводством высокое качество кормов является определяющим фактором полноценного кормления животных и рентабельности производства продуктов животноводства. Низкое качество кормов особенно недопустимо в молочном животноводстве, где основные корма (сено, силос и сенаж) часто готовят из перестоявших, огрубевших трав. Такие корма животные плохо поедают из-за ограниченных возможностей объема рубца, они не добирают нужного количества энергии и питательных веществ, отсюда не способны обеспечить высокую продуктивность.

В результате в рационах молочных коров начинают преобладать концентрированные корма, что, как правило, приводит к тяжелым нарушениям обмена веществ и преждевременной выбраковке животных.

По европейским требованиям корма для жвачных следует готовить только из молодых, неперестоявших трав, в 1 кг сухого вещества которых должно содержаться не менее 10,5—12 МДж обменной энергии, 160—215 г сырого протеина и не более 160—240 г клетчатки.

Зерновые корма и корнеплоды относятся к кормам с более стабильной питательностью, поскольку их заготавливают в строго определенные сроки, когда они достигают высоких качеств. Но корма всех групп заметно меняют свои качества при хранении. Поэтому оценивать их качество следует как при заготовке, так и периодически в течение всего срока хранения. Результаты анализов важно учитывать при балансировании рационов и совершенствовании полноценности кормления животных.

Качество кормов оценивают по органолептическим признакам и химическому составу.

В кормлении животных используют корма растительного и животного происхождения, а также кормовые добавки. Растительные корма по сходству их химического состава и физиологического действия подразделяются на сочные (зеленый корм, силос, сенаж корнеклубнеплоды и др.), грубые (сено, солома, мякина и др.), концентрированные (зерновые злаковые и бобовые) и побочные продукты перерабатывающих предприятий (отруби, жмыхи, шроты, жом, мезга, барда, пивная дробина и др.).

К кормам животного происхождения относят молоко и продукты его переработки, рыбную и мясокостную муку и др. В группу кормовых добавок входят минеральные подкормки и продукты химического и микробиологического синтеза (аминокислоты, витамины, ферменты, дрожжи и др.). Особую группу составляют комбикорма и различные кормовые добавки — белково-витаминные (БВД), белково-минерально-витаминные (БМВД) и другие, содержащие в своем составе как растительные, так и животные корма. Кормовые добавки широко используют для приготовления полноценных и сбалансированных комбикормов и рационов для животных разных видов непосредственно в хозяйствах или на межхозяйственных комбикормовых заводах.

7.1. ОРГАНОЛЕПТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОРМОВ

7.1.1. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЗЕЛЕНЫХ КОРМОВ

Зеленые (травянистые) корма в годовом кормовом балансе жвачных животных занимают от 35 до 40 %, что зависит от длительности пастбищного сезона. Их охотно поедают животные, и они являются дешевым источником энергии, питательных веществ, а также каротина, токоферолов, незаменимых жирных кислот и других БАВ.

По соотношению в золе суммы кислых (S, P, Cl) и основных (Ca, K, Mg, Na) эквивалентов зеленые корма имеют щелочную реакцию, что в значительной степени определяет их благотворное влияние на обмен веществ у животных.

Показатели качества зеленых кормов, согласно ОСТ 10273—2001, приведены в таблице 46.

Энергетическая и протеиновая питательность 1 кг зеленых кормов натуральной влажности составляет 2—3 МДж обменной энергии — ОЭ (0,18—0,24 корм. ед.) и 30—50 г сырого протеина, тогда как в 1 кг сухого вещества сеяных злаково-бобовых трав, убранных в начале колошения и ветвления, достигает 10—11,5 МДж ОЭ и 175—200 г сырого протеина, 18—23 % сырой клетчатки. В перестоявших травах эти показатели питательности составляют не более 7—8,5 МДж ОЭ и 85—95 г сырого протеина на 1 кг сухого вещества корма, но резко возрастает доля сырой клетчатки (до 32—35%).

Зеленые корма не должны иметь посторонних запахов (экскрементов животных, дизельного топлива и т. п.) и должны иметь

46. Нормы содержания сухих и питательных веществ в зеленых кормах

Зеленый корм	Массовая доля сухого вещества, не менее, %	Массовая доля в сухом веществе		
		сырого протеина, %, не менее	сырой клетчатки, %, не более	сырой золы, %, не более
Сеяные злаковые многолетние и однолетние травы[1]	20	13	26	10
Сеяные бобовые многолетние и однолетние травы[2]	20	17	27	11
Люцерна[4]	21	18	30	11
Сеяные бобовые или злаково-бобовые многолетние травы[2]	20	15	27	10
Зернофуражные культуры[1]	17	11	27	10
Кукуруза[6]	17	9	26	8
Подсолнечник и его смесь с другими культурами[2]	15	10	27	12
Рапс, сурепица и другие капустные культуры[3]	14	16	20	10
Травы природных кормовых угодий[1]	18	10	28	10
Листья корнеплодов[5]	12	15	14	15

Фазы вегетации растений: 1 — не позднее начала колошения; 2 — не позднее начала цветения; 3 — не позднее цветения; 4 — не позднее конца цветения; 5 — перед уборкой корнеплодов; 6 — не позднее начала образования початков.

цвет, свойственный растениям, из которых они приготовлены. Содержание вредных и ядовитых растений в зеленых кормах должно быть не более 1 % по массе, токсичных элементов и пестицидов не должно превышать МДУ, установленных Департаментом ветеринарии МСХ России, а содержание нитратов и нитритов не должно превышать 500 и 10 мг/кг корма по NO_3 и NO_2 соответственно. Но при использовании высоких доз азотных удобрений концентрация нитратов возрастает в 2—3 раза. Такие зеленые корма к скармливанию животным не пригодны. Избыток нитратов сопровождается разрушением каротина, превращением гемоглобина в метгемоглобин, токсикозом и гибелью животных.

При скармливании зеленых кормов из кормушек обращают внимание на их свежесть, цвет и запах. Корма должны быть свежими, без загрязнений и плесени, сохранять цвет и запах, характерные для растений, из которых они получены. Не допускаются к скармливанию слежавшиеся и перегретые зеленые корма.

Для зоотехнического анализа и проверки соответствия качества зеленого корма требованиям настоящего стандарта от каждой партии корма или площади пастбища отбирают не менее 4 кг корма, из которого отбирают среднюю пробу по общепринятым правилам.

7.1.2. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЕНА

Сено — один из основных кормов в зимних рационах для крупного рогатого скота, овец и лошадей. Высококачественное сено — источник высококачественного протеина, сахаров, клетчатки, минеральных веществ, витаминов D (при солнечной сушке) и группы В (из бобовых трав). Натуральное сено в рационах жвачных — важнейший регулятор функции рубцового пищеварения, обеспечивающего активный синтез ЛЖК и микробного белка.

Сено относится к щелочным кормам, поскольку в его золе преобладают основные эквиваленты, чем в значительной степени определяется его благотворное влияние на обмен веществ у животных.

Требования ОСТ 10243—2000 к качеству сена приведены в таблице 47.

47. Показатель для определения качества сена

Массовая доля в сухом веществе	Нормы для класса		
	I	II	III
Сырого протеина в сене, %, не менее:			
сеяном бобовом	15	13	10
сеяном злаковом	12	10	8
сеяном бобово-злаковом	13	10	9
естественных сенокосов	11	9	7
Сырой клетчатки в сене, %, не более:			
сеяном бобовом	28	30	31
сеяном злаковом	30	32	33
сеяном бобово-злаковом	29	31	32
естественных сенокосов	30	32	33
Сырой золы, %, не более	10	11	12

Примечание. Нормы установлены с учетом того, что классы качества сена определяют не ранее 30 сут после закладки его на хранение и не позднее 10 сут до начала скармливания животным.

Питательность сена во многом зависит от ботанического состава, сроков вегетации трав и технологии заготовки. Основное условие получения высококачественного сена — своевременное скашивание трав. Сено, приготовленное из молодых трав по прогрессивным технологиям, содержит в 1 кг сухого вещества от 9,5 до 11,5 МДж ОЭ и 150—180 г сырого протеина, а из перестоявших трав — только 7,5—8 МДж ОЭ и 70—80 г сырого протеина соответственно. Цвет хорошего сена из сеяных трав от зеленого до желто-зеленого, запах свежий, приятный.

В сене, приготовленном из сеяных трав, наличие вредных и ядовитых трав не допускается. В сене естественных кормовых угодий допускается их содержание для I класса не более 0,5 %, для II и III классов — не более 1 %. Сено, содержащее вредные и ядовитые растения сверх установленных настоящим стандартом норм, а

также с признаками порчи (плесневения, затхлости, гниения) относится к неклассному и не подлежит скармливанию.

Травостои, предназначенные для заготовки сена, обработанные пестицидами, убирают не ранее чем предусмотрено инструкцией по применению данного пестицида. При скашивании и ворошении трав на сено не допускается загрязнение сырьевой массы горюче-смазочными материалами, комьями земли и другими посторонними предметами. Содержание нитратов и нитритов в сене не должно превышать допустимых норм (1000 и 10 мг/кг по NO_3 и NO_2 соответственно).

При наличии данных о содержании в сене сухого вещества (СВ) и клетчатки можно определить содержание в нем концентрации ОЭ (КОЭ), используя формулу

$$КОЭ = 13{,}43 - 14{,}1 \cdot СК,$$

где СК — количество сырой клетчатки в 1 кг СВ корма или рациона, кг.

Например, в 1 кг злакового сена содержится 0,32 кг (32 %) СК, тогда КОЭ = 13,43 − 14,1 · 0,32 = 13,43 − 4,51 = 8,92 МДж/кг СВ сена. Если в данном случае влажность сена равна 17 %, то КОЭ натурального сена будет равна 8,92 · 0,83 = 7,4 МДж/кг.

7.1.3. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СИЛОСА

Силос — самый распространенный сочный корм, который готовят из свежескошенной или провяленной зеленой массы путем консервации химическими или органическими кислотами, образующимися из сахаров массы в результате жизнедеятельности молочнокислых бактерий в анаэробных условиях.

При соблюдении всех технологических приемов в силосе хорошего качества накапливается 1,8—2,2 % органических кислот, в том числе 50—75 % молочной, а pH составляет 3,8—4,3. В 1 кг хорошего силоса содержится 1,8—2 МДж ОЭ и 30—40 г сырого протеина. Главные условия получения силоса хорошего качества — подбор трав с оптимальным минимумом сахара, необходимая влажность силосуемой массы (65—75 %) и создание анаэробных условий. При пониженной влажности (60 % и менее) масса плохо уплотняется, что способствует развитию гнилостных бактерий и плесени, а при повышенном содержании влаги (80 % и более) отмечаются большое выделение сока и потеря питательных веществ. При избытке в силосуемой массе сахаров в силосе преобладает спиртовое брожение, повышается доля масляной кислоты и возрастает потеря его питательности с соком. Недостаток сахара не обеспечивает нужной кислотности, pH составляет 4,5—5,5, что указывает на гнилостное разложение белков с выделением аммиака.

На качество силоса влияет длительность заполнения емкости зеленой массой, своевременная и качественная его герметизация. Обязательно учитываемые параметры качества силоса из разных трав представлены в таблице 48.

48. Показатели для определения качества силоса (извлечение из ОСТ 10202—97)

Показатель	Нормы для класса		
	I	II	III
Массовая доля сухого вещества, %, не менее, в силосе из:			
кукурузы	26	20	16
сорго	27	25	23
однолетних бобовых трав	28	26	25
однолетних бобово-злаковых смесей	25	20	18
однолетних злаковых трав	20	20	18
многолетних провяленных трав	30	30	25
Массовая доля в сухом веществе сырого протеина, %, не менее, в силосе из:			
кукурузы и сорго	7,5	7,5	7,5
бобовых трав	15	13	11
злаково-бобовых трав и смесей других растений с бобовыми	13	11	9
злаковых трав, подсолнечника, других растений и их смесей	11	9	8
Сырой клетчатки, %, не более	30	33	35
Сырой золы, %, не более, в силосе из:			
подсолнечника	13	15	17
других растений	10	11	13
Масляной кислоты, %, не более	0,5	1,0	2,0
Молочной кислоты в общем количестве (молочной, уксусной, масляной) кислот, %, не менее, в силосе из:			
кукурузы, сорго, суданской травы	55	50	40
других растений	50	40	30
pH силоса из:			
кукурузы	3,8—4,3	3,7—4,4	3,6—4,5
других растений (кроме люцерны)	3,9—4,3	3,9—4,3	3,8—4,5

Примечания. 1. В силосе, приготовленном из провяленных трав или с применением натрия пиросульфата, pH не определяют. 2 В силосе, законсервированном натрия пиросульфатом, пропионовой кислотой и ее смесями с другими кислотами, массовую долю масляной кислоты не определяют. 3. В силосе из свежеприготовленных однолетних и многолетних трав с применением химических веществ и биопрепаратов массовую долю сухого вещества не учитывают. 4. Если силос по массовым долям сухого вещества, сырого протеина и масляной кислоты соответствует требованиям I или II класса настоящего стандарта, показатели pH и массовых долей сырой клетчатки, сырой золы и молочной кислоты не являются браковочными.

Содержание каротина в силосе согласно ОСТ 10202—97 не нормируется. Но его доля в силосе из злаковых культур составляет в среднем 10—20 мг/кг, а из бобовых — 30—40 мг/кг корма.

При оценке качества силоса целесообразно учитывать цвет, запах и структуру частиц корма. Силос отличного и хорошего качества должен быть зеленым или желтовато-зеленым с оливковым оттенком, иногда серовато-зеленым. Запах приятный фруктовый или квашеных овощей, или слабоуксусный, быстро исчезающий с рук после растирания. Частицы растений хорошо сохранены, не растираются и оставляют на руках слабые отпечатки.

Силос с pH 3,7 и ниже рекомендуется раскислять. Для этого используют натрия бикарбонат, аммиачную или известковую воду в соответствующих дозах.

Не допускается к скармливанию силос низкого качества, неклассный, имеющий неприятный запах [гнилостный, селедочный (за счет образования триметиламина) или испорченного сыра], грязно-зеленого, темно-бурого или черного цвета. Частицы растений такого силоса разрушены и мажутся при растирании.

Силос относится к кислым кормам, что следует учитывать при его использовании в рационах высокопродуктивных и глубокостельных коров. Тем более, что в силосе низкого качества наряду с высоким содержанием масляной кислоты накапливаются высокотоксичные вещества — амины, альдегиды, кетоны, нитрозамины, а в ряде случаев и микотоксины. Все это требует тщательного и постоянного ветеринарного контроля за использованием силоса.

В процессе хранения силос следует постоянно контролировать по содержанию масляной кислоты, pH, сухого вещества.

7.1.4. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЕНАЖА

Сенаж — менее кислый (pH 4,9—5,4), но более питательный, чем силос, корм, приготовленный из трав, провяленных после скашивания до влажности 50—55 %. Консервация растительной массы происходит не за счет активной кислотности, а за счет «физиологической сухости» среды и выделяемого CO_2. В результате этого кислотообразование в сенаже ограничено. В сенаже лучше сохраняются питательные вещества и сахар. В 1 кг хорошего сенажа содержится 3,6—4,9 МДж ОЭ, 53—100 г сырого протеина, 30—40 мг каротина и 18—23 г сахара.

В качестве сырья для сенажа используют многолетние и однолетние травы, в первую очередь люцерну, клевер, их смеси со злаками, викоовсяную смесь.

Требования к качеству сенажа представлены в ОСТ 10201—97 (табл. 49).

Запах хорошего сенажа ароматный, фруктовый. Сенаж среднего качества может иметь запах свежеиспеченного ржаного хлеба, что свидетельствует о перегревании корма при закладке или хранении, а также о снижении переваримости органического вещества. Не-

49. Показатели для определения качества сенажа

Показатель	Нормы для класса		
	I	II	III
Массовая доля сухого вещества, %	40—60	40—60	40—60
Массовая доля в сухом веществе сырого протеина, %, не менее, в сенаже из:			
бобовых трав (кроме клевера)	16	14	12
клевера	15	13	11
бобово-злаковых трав	13	11	9
злаковых трав	12	10	8
Массовая доля в сухом веществе сырой клетчатки, %, не более	30	33	35
Массовая доля в сухом веществе масляной кислоты, %, не более	—	0,3	0,6
Массовая доля в сухом веществе сырой золы, %, не более	10	11	13

Примечание. Качество сенажа из зернофуражных культур (зерносенаж) определяют по ОСТ 10029.

льзя использовать сенаж, пахнущий плесенью, прогорклым маслом, уксусом, навозом или селедкой.

Цвет хорошего сенажа в зависимости от вида сырья зеленый, буровато-зеленый, желтовато-зеленый. Сенаж среднего и ниже среднего качества может быть светло- и темно-коричневым, что свидетельствует о перегревании массы. Нельзя использовать сенаж с преобладанием темных тонов — бурый, серый, черный, а также с наличием плесени, загрязненный землей и другими инородными примесями.

В доброкачественном сенаже полностью сохраняется структура растений, испорченный же приобретает мажущуюся консистенцию и оставляет при растирании на руках грязные пятна.

7.1.5. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ИСКУССТВЕННО ВЫСУШЕННЫХ КОРМОВ

Корма, получаемые при искусственной сушке трав с использованием высокотемпературной технологии, изготовляют в виде муки, резки, гранул, брикетов из молодых, хорошо облиственных растений бобовых, злаковых, а также бобово-злаковых травосмесей. Бобовые травы скашивают в фазе не позднее полной бутонизации растений, а злаковые — не позднее начала колошения.

Искусственно высушенные корма относятся к концентрированным щелочным кормам, богатым ОЭ, протеином и каротином, охотно поедаются животными всех видов, в том числе птицами.

Так, например, травяная мука, приготовленная из молодых трав, по энергетической питательности приближается к зерновым концентратам и превосходит их по полноценности белка, содержанию минеральных веществ, витаминов С, Е, В, К и других БАВ. Ее широко используют в качестве ценного компонента комбикормов и частично заменителя концентрированных кормов в рационах животных.

Скашивание трав в более поздние фазы, а также несоблюдение технологии заготовки уменьшает содержание каротина, протеина и увеличивает массовую долю клетчатки в них.

Требования к качеству искусственно высушенных кормов определены в ОСТ 10242—2000 (табл. 50).

50. Показатели для определения качества искусственно высушенных травяных кормов

Показатель	Нормы для класса		
	I	II	III
Массовая доля в сухом веществе:			
сырого протеина, %, не менее	19	17	15
сырой клетчатки, %, не более	23	25	27
сырой золы, %, не более	10	11	12
Содержание каротина в сухом веществе, %, не менее	200	150	100

Примечания. 1. Содержание каротина указано для свежеприготовленных или хранившихся в хозяйстве до 10 дней искусственно высушенных травяных кормов. 2. Травяную муку предприятиям комбикормовой промышленности хозяйства поставляют I и II классов.

Влажность искусственно высушенных травяных кормов независимо от класса составляет 9—12 %; гранул и брикетов — 9—14 и резки — 10—15 %. Пересушивание кормов приводит к снижению переваримости питательных веществ и увеличению потерь каротина.

При оценке качества гранул и брикетов учитывают технологию приготовления, регламентируют их крошимость и размеры. Диаметр гранул должен быть от 4,7 до 14,0 мм, а крошимость — не более 12 %, брикетов — не более 15 %.

Каротин — самое нестойкое соединение при хранении травяной муки, тогда как содержание протеина, углеводов и минеральных веществ в ней мало изменяется. Потери каротина зависят от условий хранения. Они значительно возрастают при повышении температуры, на свету и при высокой относительной влажности. Поэтому помещение для длительного хранения травяной муки должно быть затемненным, сухим (влажность воздуха 65—70 %) и прохладным (2—5 °С). Хранят муку в многослойных бумажных или полиэтиленовых мешках, при этом в течение 5—6 мес теряется 50—75 % каротина. При стабилизации в муке каротина антиокси-

дантами (сантохином, дилудином, ионолом, натрия пиросульфатом и др.) в дозе 150—200 г/т потери каротина снижаются в 1,5—2 раза. Сохранность каротина в травяной муке повышает гранулирование ее.

При оценке качества искусственно высушенных кормов учитывают их внешний вид: цвет, запах, наличие примесей. Цвет корма должен быть темно-зеленым или зеленым, запах доброкачественного корма — приятным, свежим. Массовая концентрация металломагнитных частиц размером более 2 мм и частиц с острыми краями не допускается, частиц размером до 2 мм допускается не более 50 мг/кг корма.

7.1.6. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЗЕРНОВЫХ КОРМОВ

Все зерновые корма, используемые в кормлении животных в составе комбикормов или в форме дерти в составе рационов, разделяются на две группы — злаковые и бобовые. Первые являются высококрахмалистыми источниками энергии, в 1 кг которых содержится в среднем 9,2—12,8 МДж ОЭ (0,95—1,3 корм. ед.) и 92—145 г сырого протеина. Зерно бобовых культур превосходит злаковое по содержанию энергии, но особенно протеина и лизина. В 1 кг их содержится 12,5—15,0 МДж ОЭ (1,1—1,45 корм. ед.), 218—340 г сырого протеина. Переваримость протеина зернобобовых выше (83—85 %), чем злаковых (75 %).

Требования, предъявляемые к качеству зерна, зафиксированы соответствующими стандартами и техническими условиями (табл. 51). Некоторые показатели едины для всех культур, другие могут изменяться. Доброкачественность зернофуража определяется органолептически на месте. Цвет и блеск хорошего зерна соответствуют виду и сорту его, запах — свойственный нормальному зерну, не затхлый, не плесенный и не гнилостный, не солодовый и без посторонних запахов. Влажность, которая определяет сохранность зерна от порчи, разложения углеводов и прогоркания жиров, колеблется от 15 (сорго и просо) до 17 % (вика, чечевица).

Нормальное зерно пшеницы имеет титруемую кислотность 3°, ржи 3,6°; при начале порчи 3,5—4,5°; опасное для хранения 5,5°; не выдерживает хранения зерно при кислотности 7,5°. Кислотность испорченного зерна 9,5°. Скармливать его свиньям и птице противопоказано.

Зерно отличного и хорошего качества должно быть хорошо выровненным, высоконатурным, не заражено амбарными вредителями.

Подозрительным считается зерно, в значительной степени пораженное грибными и бактериальными заболеваниями, загрязненное частицами земли, незначительно загнившее, содержащее более 15 % проросших семян вместе с сорной примесью (в том числе вредных и ядовитых семян более 1 % и сорной примеси более 8 %), издающее затхлый или солодовый запах, а также зерно, зараженное амбарными вредителями. Перед скармливанием подозрительный фураж следует проветрить, просушить или пропарить.

51. Требования, предъявляемые к качеству зернового сырья (ограничительные)

Показатель	Овес	Ячмень	Кукуруза	Пшеница	Просо	Рожь	Сорго	Горох	Вика	Бобы кормовые	Чина	Люпин кормовой	Чечевица	Нут
Влажность, %, не более	15,5	15,5	16,0	16,0	15,0	16,0	15,0	16,0	17,0	16,0	16,0	16,0	17,0	16,0
Содержание сорной примеси, %, не более:	5	8	5	8	5	5	5	5	5	5	5	5	3	—
минеральной	1	—	—	—	—	—	1	—	1	1	1	1	1	—
куколя	0,5	0,5	—	0,5	—	0,5	0,5	—	—	—	—	—	—	—
Содержание вредной примеси, %, не более:	0,2	0,2	0,2	0,2	—	0,2	0,2	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
спорыньи, головни и плевела опьяняющего (по совокупности)	0,1	0,1	0,15	0,1	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—
горчака ползучего, софоры лисохвостной и вязеля разноцветного	0,04	0,1	0,1	0,1	—	0,1	0,04	—	—	—	—	—	—	—
гелиотропа опушенноплодного и триходесмы седой	Не допускается													
Содержание зерновой примеси, %, не более	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0 Содержание алкалоидных семян не более 3 %	15,0	15,0
Зараженность хлебных злаков вредителями	Допускается зараженность только клещом													
Степень зараженности	I	II	Не допускается	II	II	I	II	I	I	I	I	I	I	II

Непригодно к скармливанию зерно черное, гнилое, сильно пораженное или неустранимо испорченное плесенью и другими грибными заболеваниями, сильно зараженное амбарными вредителями, а также содержащее значительное количество минеральных и вредных примесей, которые невозможно удалить.

Наличие амбарных вредителей можно установить при осмотре партии корма, из которого отбирают около 1 кг зерна. Питательность зерна, зараженного амбарными вредителями, снижается ежемесячно на 5,5—7,9 %. Образец зерна просеивают через сито с отверстиями диаметром 1,5 и 2,5 мм. Остаток на сите и проход через сито рассыпают тонким слоем на стекле с подложенной под него черной бумагой и рассматривают с помощью лупы.

При зараженности I степени в 1 кг зерна насчитывают от 1 до 20 клещей или от 1 до 5 долгоносиков, при II степени — более 20 клещей или от 6 до 20 долгоносиков, при III степени обнаруживают сплошной слой клещей в местах их скопления или более 10 долгоносиков (мертвые вредители, кроме долгоносиков, относится к сорной примеси). Корма, имеющие зараженность III степени, скармливать животным опасно.

Все зернобобовые корма, особенно соя, содержат антипитательные вещества, главным образом ингибиторы трипсина и химотрипсина. В рационы животных такую сою можно вводить без предварительной обработки, но моногастричные требуют ее специальной обработки — гидробаротермической, разрушающей ингибиторы протеаз. Эффективность обработки сои определяют по активности фермента уреазы. Нормально обработанное зерно сои должно иметь уреазную активность (по разности pH за 30 мин) в пределах 0,1—0,2 усл. ед.

Прогревание или гранулирование повышает питательность гороха и некоторых других зернобобовых культур.

7.1.7. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА МУЧНИСТЫХ КОРМОВ

К мучнистым кормам относят кормовую муку (ячменную, овсяную, кукурузную и др.), а также подобные продукты мукомольного и крупяного производства (отруби, мучную пыль, гречневую и пшеничную мучку, просяную мучель).

Требования стандартов к мучнистым кормам:

цвет — коричнево-серый (мучка кормовая пшеничная), красно-желтый с сероватым оттенком (отруби пшеничные), серый с коричневым или зеленоватым оттенком (отруби ржаные);

запах — не затхлый, не плесенный и не посторонний для данного мучнистого корма;

кислотность — не более 5%;

влажность — не более 15%;

вредных примесей — не более 0,05 %, в том числе головни и спорыньи (отдельно или вместе) 0,05 %, горчака и вязеля 0,04, куколя 0,1 %, семян гелиотропа и триходесмы седой быть не должно.

Амбарные вредители и металлопримеси размером более 2 мм, с острыми концами и краями не допускаются; металлических частиц размером до 2 мм в 1 кг корма может быть не более 5 мг, в том числе размером от 0,5 до 2 мм — не более 1,5 мг.

Влажность мучнистых кормов можно установить приблизительно непосредственно в хозяйстве. Сухой корм при сжатии в ладони слегка хрустит, при раскрытии ее рассыпается. Корм средней сухости при этом сохраняет форму комка, легко рассыпающегося при прикосновении пальца. Влажный мучнистый корм при сжатии в ладони образует комок, который при раскрытии ее сохраняет свою форму и не рассыпается при прикосновении пальцами. Точно влажность корма определяют в лаборатории при 130 °С в течение 40 мин.

Мучнистые корма очень гигроскопичны. Их необходимо хранить в сухих, хорошо проветриваемых помещениях.

Запах мучнистых кормов обычно мало выражен. Для усиления его берут 20 г корма в стакан, заливают горячей (до 60 °С) водой. Стакан закрывают крышкой, через 3—5 мин воду сливают и определяют запах корма.

Вкус мучнистых кормов пресный, без кисловатого и горьковатого привкуса (показатели порчи корма). Сладкий солодовый вкус свойствен кормам, полученным из проросшего и сырого зерна. Медовый запах отмечается при сильной зараженности мучнистых кормов клещами, селедочный и полынный — при засорении спорами головни и семенами полыни.

Для определения чистоты берут 50 г корма и просеивают в течение 2 мин через набор сит. Содержание каждого сита в отдельности переносят на лист белой бумаги. Выделяют металлопримеси (магнитом), неразмолотые зерна, семена сорных и ядовитых трав, спорынью и взвешивают их с точностью до 0,01 г.

Примеси песка и другие минеральные соединения определяют озолением пробы корма в муфеле. Золу растворяют в соляной кислоте, фильтруют через беззольный фильтр, затем переносят фильтр с примесями в прокаленный взвешенный тигель и снова озоляют, охлаждают и взвешивают.

В муке, отрубях и комбикорме допускается не более 0,2—0,08 % минеральных примесей (в зависимости от вида и возраста животных).

Мучнистые корма не должны быть заражены мучным клещом, мучным хрущаком, хлебным точильщиком, мучной молью, мельничной огневкой и др. Корм просеивают через сита № 056 и 067, а отруби — через сита № 08 и 056. Проход через сито используют для выявления клещей, а сход — для обнаружения жучков, куколок и личинок.

Непригодны к скармливанию мучнистые корма с сильным запахом гнили или плесени, кислым или горьким вкусом, сильно пораженные головней, спорыньей или засоренные семенами куколя.

7.1.8. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЖМЫХОВ И ШРОТОВ

Жмыхи и шроты — ценные высокопротеиновые корма, получаемые как побочные продуты маслоэкстракционного производства из семян подсолнечника, конопли, льна, сои и других масличных культур путем отжима масла или экстрагированием его углеводородными растворителями. Содержание жира составляет в жмыхах 7—9 %, а в шротах 1,5—2,5 %. Жмыхи выпускают в виде ракушек и дробленым, шрот — в рассыпном виде или в брикетах и гранулах различных форм и размеров. Стойкость жмыхов при хранении зависит от плотности прессования. Шрот в силу большой гигроскопичности хранится хуже. Требования ГОСТов к качеству различных жмыхов и шротов приведены в таблице 52. Доброкачественные жмыхи и шроты содержат 6—10 % влаги, не более 450 мг/кг нитратов и 10 мг/кг нитритов; не должны содержать металлических примесей размером до 2 мм и не должны быть загрязнены посторонними примесями, заражены вредителями и поражены грибами или плесенью.

Подозрительные жмыхи и шроты содержат металлические (0,01 % размером до 2 мм) или минеральные примеси, издают затхлый запах, незначительно поражены плесенью и имеют горький

52. Требования госстандартов к качеству жмыхов и шротов

Вид корма	Содержание в абсолютно сухом		
	сырого протеина, %, не менее	корм. ед., не менее	сырой клетчатки, %, не более
			Жмых
Подсолнечниковый	38,0	1,04	20,0
Конопляный	35,0	1,03	—
Льняной	34,0	1,19	9/14
Соевый[1]	42,5	1,26	7,0
Рапсовый[2]	37,0	1,15	16/1,5
Хлопковый (1-й и 2-й сорта)[3]	37/30	1,16/1,09	12/16
			Шрот
Подсолнечниковый	39,0	0,98	23,0
Конопляный	32,0	0,97	—
Льняной	36,0	1,11	9/14
Соевый[1]	45,0	1,18	7,0
Рапсовый[2]	37,0	1,06	16,0
Хлопковый (1-й и 2-й сорта)[3]	44/36	1,08/0,93	14/25

[1] В тостированном соевом жмыхе и шроте активность уреазы по разности pH должна составлять 0,1—0,3 и 0,1—0,2 (за 30 мин) соответственно.

привкус. Подозрительные жмыхи и шроты перед скармливанием пропаривают, удаляют из них металлические примеси с помощью магнита. Дачу такого корма уменьшают.

Непригодны к скармливанию животным загнившие, сильно пораженные плесенью и горькие на вкус жмыхи и шроты.

7.1.9. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВОЙ МУКИ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Кормовая мука животного происхождения вырабатывается в соответствии с требованиями межгосударственного стандарта по технологическим инструкциям с соблюдением санитарных и ветеринарно-санитарных правил в рассыпном и гранулированном виде. В зависимости от состава сырья ее подразделяют на мясокостную, мясную, кровяную, костную и из гидролизированного пера; в зависимости от качества — на 1, 2 и 3-й сорта (табл. 53).

Упаковывают кормовую муку в бумажные мешки и транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с правилами перевоза. Хранят в крытом сухом помещении. Допускается бестарное хранение кормовой муки в открытых емкостях внутри помещения

веществе золы, нерастворимой в 10%-ной HCl, %, не более	Цвет	Примечание
1,0	Серый разных оттенков	ГОСТ 80—96
1,5	Темно-серый разных оттенков	ГОСТ 11694—66
9,0	От серого до светло-коричневого	ГОСТ 10974—95
1,5	От светло-желтого до светло-бурого	ГОСТ 27149—95
	От серого до светло-коричневого	ГОСТ 11246—96
2/2	От светло-желтого до темно-желтого	ГОСТ 68—74
1,0	Серый разных оттенков	ГОСТ 11246—96
1,5	То же	ГОСТ 17256—71
1,5	»	ГОСТ 10471—96
1,5	От светло-желтого до светло-бурого	ГОСТ 1220—96
1,5	От серого до светло-коричневого	ГОСТ 30257—95
0,5/1,0	То же	ГОСТ 606—75

[2] В рапсовом жмыхе массовая доля изотиоционатов в пересчете на абсолютно сухое вещество не должна превышать 0,8 %. [3] Массовая доля свободного госсипола в пересчете на абсолютно сухое вещество должна составлять не более 0,02 %.

53. Требования ГОСТ 17536—82 к кормовой муке животного происхождения

Показатель	Характеристики и нормы для муки						
	мясокостной			мясной	кровяной	костной	из гидролизированного пера
	1-й сорт	2-й сорт	3-й сорт				
Внешний вид	Продукт сыпучий, без плотных нерассыпающихся при надавливании комков или гранул диаметром не более 12,7 мм, длиной не более двух диаметров, крошимостью не более 15 %						
Запах	Специфический, но не гнилостный и не затхлый						
Крупность помола (для рассыпной муки) — остаток частиц, %, не более:							
на сите с диаметром отверстий 3 мм	5	5	5	5	5	5	5
на сите с диаметром отверстий 5 мм	Не допускается						
Массовая доля посторонних примесей:							
металломагнитных в виде частиц размером до 2 мм, кг · млн$^{-1}$ (мг на 1 кг муки), %, не более	150	200	200	200	200	200	200
золы, нерастворимой в соляной кислоте, %, не более	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	2,0
Массовая доля влаги, %, не более	9	10	10	9	9	9	9
Массовая доля протеина, %, не менее	50	42	30	64	81	20	75
Массовая доля жира, %, не более	13	18	20	14	3	10	4
Массовая доля золы, %, не более	26	28	38	11	6	61	8
Массовая доля клетчатки, %, не более	2	2	2	2	1	—	4
Наличие патогенных микроорганизмов	Не допускается						
Токсичность	То же						
Массовая доля антиоксидантов к массе жира в муке, %, не более	0,02	0,02	0,02	0,02	—	—	—

Примечание. Нормы по химическим показателям (протеину, жиру, клетчатке, минеральным примесям) даны с учетом предельного содержания влаги.

и в специальных бункерах как внутри, так и вне помещения с учетом ветеринарно-санитарных требований и в соответствии с требованиями документации, утвержденной в установленном порядке.

Качество кормовой муки тем выше, чем меньше в ней золы и жиров и больше протеина. Жирная мука быстро портится при хранении.

Мука не должна издавать затхлый, гнилостный или посторонний запах. Муку с затхлым и гнилостным запахом, темным цветом скармливать животным не рекомендуется.

Крупность помола муки устанавливают путем просеивания через сита. Навеску в 500 г, взятую из объединенной пробы, просеивают через сито с диаметром отверстий 3,0 мм. Остаток на сите взвешивают и определяют его содержание в процентах.

Влажность муки определяют путем высушивания ее (5 г) в боксе при температуре 100—105 °С до постоянной массы.

Металлические примеси находят магнитом.

Минеральные примеси (золу), нерастворимые в соляной кислоте, определяют следующим образом: 5 г муки озоляют в фарфоровом тигле и обрабатывают 50 мл 10%-ного раствора HCl при нагревании на водяной бане до полного растворения кальциевых и магниевых солей. Раствор пропускают через беззольный фильтр, осадок промывают водой до исчезновения реакции на хлор (проба раствором серебра нитрата), сушат при 100—105 °С и сжигают в фарфоровом тигле при 600—700 °С до постоянной массы. Охлаждают и взвешивают. Содержание минеральных примесей (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{(m_2 - m_1)}{m} \cdot 100,$$

где m_2 — масса прокаленного остатка с тиглем, г; m_1 — масса тигля, г; m — масса навески муки, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

7.1.10. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВЫХ ЖИРОВ

Все жиры, используемые в комбикормах и рационах животных, в том числе птицы, по природе относятся к животным или растительным и обладают различными физико-химическими свойствами, энергетической и биологической ценностью. Из животных жиров наибольшее применение получил жир животный кормовой, который представляет собой смесь говяжьего, свиного и бараньего жира. Согласно ГОСТ 17483—72, жир животный кормовой выпускают двух сортов (табл. 54). В его составе содержится примерно равное количество насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, в том числе 6—9 % линолевой кислоты. Энергетическая питательность 1 кг жира кормового для свиней и птицы в среднем составляет 35—37 МДж ОЭ, а для крупного рогатого скота — 34—35 МДж ОЭ.

53. Требования ГОСТ 17536—82 к кормовой муке животного происхождения

Показатель	Характеристики и нормы для муки						
	мясокостной			мясной	кровяной	костной	из гидролизованного пера
	1-й сорт	2-й сорт	3-й сорт				
Внешний вид	Продукт сыпучий, без плотных нерассыпающихся при надавливании комков или гранул диаметром не более 12,7 мм, длиной не более двух диаметров, крошимостью не более 15 %						
Запах	Специфический, но не гнилостный и не затхлый						
Крупность помола (для рассыпной муки) — остаток частиц, %, не более:							
на сите с диаметром отверстий 3 мм	5	5	5	5	5	5	5
на сите с диаметром отверстий 5 мм	Не допускается						
Массовая доля посторонних примесей:							
металломагнитных в виде частиц размером до 2 мм, кг · млн$^{-1}$ (мг на 1 кг муки), %, не более	150	200	200	200	200	200	200
золы, нерастворимой в соляной кислоте, %, не более	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	0,5	2,0
Массовая доля влаги, %, не более	9	10	10	9	9	9	9
Массовая доля протеина, %, не менее	50	42	30	64	81	20	75
Массовая доля жира, %, не более	13	18	20	14	3	10	4
Массовая доля золы, %, не более	26	28	38	11	6	61	8
Массовая доля клетчатки, %, не более	2	2	2	2	1	—	4
Наличие патогенных микроорганизмов	Не допускается						
Токсичность	То же						
Массовая доля антиоксидантов к массе жира в муке, %, не более	0,02	0,02	0,02	0,02	—	—	—

Примечание. Нормы по химическим показателям (протеину, жиру, клетчатке, минеральным примесям) даны с учетом предельного содержания влаги.

и в специальных бункерах как внутри, так и вне помещения с учетом ветеринарно-санитарных требований и в соответствии с требованиями документации, утвержденной в установленном порядке.

Качество кормовой муки тем выше, чем меньше в ней золы и жиров и больше протеина. Жирная мука быстро портится при хранении.

Мука не должна издавать затхлый, гнилостный или посторонний запах. Муку с затхлым и гнилостным запахом, темным цветом скармливать животным не рекомендуется.

Крупность помола муки устанавливают путем просеивания через сита. Навеску в 500 г, взятую из объединенной пробы, просеивают через сито с диаметром отверстий 3,0 мм. Остаток на сите взвешивают и определяют его содержание в процентах.

Влажность муки определяют путем высушивания ее (5 г) в боксе при температуре 100—105 °С до постоянной массы.

Металлические примеси находят магнитом.

Минеральные примеси (золу), нерастворимые в соляной кислоте, определяют следующим образом: 5 г муки озоляют в фарфоровом тигле и обрабатывают 50 мл 10%-ного раствора HCl при нагревании на водяной бане до полного растворения кальциевых и магниевых солей. Раствор пропускают через беззольный фильтр, осадок промывают водой до исчезновения реакции на хлор (пробы раствором серебра нитрата), сушат при 100—105 °С и сжигают в фарфоровом тигле при 600—700 °С до постоянной массы. Охлаждают и взвешивают. Содержание минеральных примесей (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{(m_2 - m_1)}{m} \cdot 100,$$

где m_2 — масса прокаленного остатка с тиглем, г; m_1 — масса тигля, г; m — масса навески муки, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

7.1.10. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОРМОВЫХ ЖИРОВ

Все жиры, используемые в комбикормах и рационах животных, в том числе птицы, по природе относятся к животным или растительным и обладают различными физико-химическими свойствами, энергетической и биологической ценностью. Из животных жиров наибольшее применение получил жир животный кормовой, который представляет собой смесь говяжьего, свиного и бараньего жира. Согласно ГОСТ 17483—72, жир животный кормовой выпускают двух сортов (табл. 54). В его составе содержится примерно равное количество насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, в том числе 6—9 % линолевой кислоты. Энергетическая питательность 1 кг жира кормового для свиней и птицы в среднем составляет 35—37 МДж ОЭ, а для крупного рогатого скота — 34—35 МДж ОЭ.

54. Требования ГОСТ 17483—72 к качеству жира животного кормового

Показатель	1-й сорт	2-й сорт
Цвет при 15—30°С	От желтого до светло-коричневого	От светло-коричневого до коричневого
Запах	Специфический, но не гнилостный	
Содержание влаги, %, не более	0,5	0,5
Содержание неомыляемых веществ, %, не более	1,0	1,5
Кислотное число, %, не более	10,0	20,0
Перекисное число, %, не более	0,03	0,1
Температура плавления жира, °С, не выше	42	—
Содержание посторонних примесей	Не допускается	

Жир животный кормовой должен быть стабилизирован за счет внесения в него при изготовлении антиоксидантов — сантохина, лилудина, бутилокситолуола и других в соответствующих дозах. Жиры с более высоким содержанием свободных кислот и пероксидов в кормлении животных не используются.

Из растительных жиров в кормлении животных используют как различные масла (подсолнечное, соевое, рапсовое, льняное и др.), так и продукты их переработки (фосфатиды, фузу, соапсток и др.). Указанные источники наряду с высокой энергической питательностью являются основными поставщиками линолевой кислоты, где ее доля составляет 45—55 % общего количества полиненасыщенных жирных кислот.

Жиры кормовые в рационы животных, в том числе птиц, вводят в соответствии с нормами, приведенными в рекомендациях (1987).

Фосфатиды — вторичный продукт рафинации растительных масел. Различают фосфатиды подсолнечные, соевые, хлопковые и др. Они обладают свойствами природных антиоксидантов, что обусловлено присутствием в их составе ряда ценных биологически активных веществ — фосфолипидов (лецитина, кефалина и др.), каротиноидов и токоферолов, холина. Жировая часть фосфатидов содержит до 55 % линолевой кислоты. Согласно ГОСТ 18227—75, кормовой фосфатидный концентрат должен иметь запах, свойственный маслу, из которого получен. Не допускается затхлый, кислый или какой-либо другой запах. Вкус не нормируется, консистенция при 20 °С текучая и пастообразная. Гарантийный срок хранения — 4 мес со дня выработки.

Содержание влаги в фосфатидном концентрате не должно превышать 3 %, фосфатидов — не менее 40, масла — не более 60 и веществ, нерастворимых в этиловом эфире, — не более 5 %. Кислот-

ное число масла, выделенного из фосфатидного концентрата, не должно превышать 35 мг КОН, йодное число не нормируется.

Фосфатидный кормовой концентрат, не соответствующий требованиям по органолептическим показателям, кислотному числу и содержанию влаги, используется только для технических целей.

Соапсток — продукт щелочной рафинации растительных масел: подсолнечного, соевого и др. Продукт малоустойчив и должен быть отгружен потребителю не позднее 10 дней со дня выработки и сопровождаться документом о качестве согласно ТУ 18-2/44—82. Доброкачественный соапсток имеет цвет от светло-коричневого до коричневого с оттенком исходных масел. Его консистенция при 20 °С от жидкой до мазеобразной, запах специфический, свойственный соапстоку. Он содержит не менее 20 % жира, а перекисное число веществ, извлеченных хлороформом, не должно превышать 0,5.

Фуза — продукт, получаемый в процессе отстаивания масла. Это густая коричнево-серая липкая масса, в составе которой 85—95 % триацилглицеринов (масла), 5—15 % фосфолипидов, некоторое количество белков. В липидах фузы содержится до 50 % ненасыщенных жирных кислот, в том числе половина представлена линолевой кислотой.

7.1.11. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА КОМБИКОРМОВ

В настоящее время комбикорма готовят практически для животных всех видов, в том числе птиц, прудовых рыб, кроликов и нутрий. Для свиней и птиц выпускают полнорационные комбикорма, тогда как для животных других видов — комбикорма-концентраты, предназначенные как дополнение к основным кормам рациона (грубым, сочным), поэтому при составлении рецептов комбикормов-концентратов учитывают не только вид, возраст и производственное назначение животных, но и качество основных кормов и структуру рационов.

Комбикорма выпускают как в виде гранул, брикетов, так и рассыпными, независимо от их состава.

Гранулированные корма изготовляют в соответствии с требованиями ГОСТ 22834—87 и оценивают их по внешнему виду, цвету, запаху, влажности, диаметру и длине гранул, а гранулы для рыб — по водостойкости и разбухаемости. Внешне гранулы должны быть цилиндрической формы с глянцевой или матовой поверхностью; цвет их должен соответствовать цвету рассыпного комбикорма, из которого их готовят, или темнее. При вводе в комбикорм мелассы цвет гранул меняется от светло-коричневого до темно-коричневого. Запах — как у набора доброкачественных компонентов исходного комбикорма, без присутствия затхлого, плесенного и других посторонних запахов.

Влажность гранулированных комбикормов для птиц, кроликов, нутрий, племенных кобыл не должна превышать 14 %, для рыб — 13,5, для остальных животных — 14,5 %.

Диаметр гранул комбикормов, предназначенных для птиц, кроликов, нутрий, поросят-сосунов, телят в возрасте 1—6 мес, прудовых карповых рыб, не должен превышать 4,7 мм; для лошадей — 4,7—14,7; для поросят-отъемышей в возрасте до 4 мес, подсосных ягнят и молодняка в возрасте свыше 4 мес — 4,7—9,7; для свиноматок всех групп, хряков-производителей, откормочных свиней всех возрастных групп, ремонтного молодняка свиней в возрасте от 4 до 8 мес, овцематок всех групп, баранов-производителей, молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 6—12 мес — 4,7—12,7; для взрослого крупного рогатого скота и молодняка свыше 2 лет — 4,7—19,0 мм. Длина гранул должна быть не более двух диаметров. Крошимость гранул — не более 22 % для сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, для кроликов и нутрий — 10, для прудовых карповых рыб — 8 %. Проход через сито с отверстиями диаметром 2 мм кормовых частиц в гранулированных комбикормах для сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, кроликов и нутрий, не должен превышать 10 %, для прудовых карповых рыб — 5 %. Водостойкость гранул для прудовых карповых рыб не должна быть менее 15 %, а разбухаемость (удвоение в объеме) гранул для рыб — не более 25 мин.

По остальным показателям качества (содержанию обменной энергии, сырого протеина и др.) гранулированные комбикорма должны соответствовать требованиям государственных стандартов и другой научно-технической документации на комбикорма для соответствующего вида животных, в том числе птиц, рыб, зверей.

7.1.12. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА БЕЛКОВО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ И АМИДО-ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫХ ДОБАВОК

Белково-витаминно-минеральная добавка (БВМД) — однородная смесь измельченных до необходимой крупности высокобелковых и минеральных кормовых средств, обогащенная биологически активными веществами (витаминами, аминокислотами, микроэлементами и др.), вводимыми в смесь в виде премиксов.

Амидо-витаминно-минеральная добавка (АВМД) — однородная смесь измельченных до необходимой крупности высокобелковых и минеральных кормовых средств, обогащенная биологически активными веществами, вводимыми в смесь в виде премиксов, и в которой часть белкового сырья заменена амидами — небелковыми азотистыми веществами (карбамидом, аммонийными солями).

БВМД и АВМД изготовляют в рассыпном виде из очищенного и измельченного сырья по рецептам, утвержденным в порядке и соответствии с нормами для каждого вида, возраста и физиологического состояния животных, в том числе птиц, и по питательности и качеству должны соответствовать ГОСТ Р 51551—2000 (табл. 55).

55. Требования ГОСТ Р 51551—2000 к питательности добавок, норма на день

Показатель	Для птицы		Для поросят-отъемышей от 2 до 4 мес	Для ремонтного молодняка свиней от 4 до 8 мес	Для свиноматок		Для свиней, откармливаемых на мясо	Для хряков
	взрослой	молодняка и бройлеров			супоросных	подсосных		
Массовая доля:								
сырого протеина, %, не менее	45	48	40	28	25	35	28	40
сырой клетчатки, %, не более	5	3,5	3	3	9	9	6	9
кальция, %, не менее	4,0	4,0	3,5—4,1	3,9—4,5	3,7—4,3	3,9—4,5	3,5—4,1	4,3—5,0
фосфора, %, не менее	1,8	2,0	2,3—2,9	2,0—2,6	1,8—2,3	2,0—2,5	1,7—2,2	2,0—2,5
натрия, %, не более	1,0	1,0	—	—	—	—	—	—
лизина, %, не менее,	2,8	3,0	2,10	1,60	1,50	2,10	2,60	2,60
метионина и цистина (в сумме), %, не менее	1,7	1,8	0,95	1,00	0,60	1,20	0,90	1,50

Продолжение по горизонтали

Показатель	Для крупного рогатого скота					Для овец		
	молодняка от 6 до 12 мес	откармливаемого молодняка	дойных коров и телок старше 1 года	высокопродуктивных коров	быков-производителей	молодняка старше 4 мес	суягных и подсосных маток	взрослых овец
Массовая доля, %, не менее:								
сырого протеина	35	30	38	38	38	31	23	27
кальция	2,9—3,6	2,5—2,9	2,9—3,6		4,7—5,9	1,6—1,8	2,0—3,3	1,6—1,9
фосфора	2,9—3,7		3,0—3,8		3,5—4,5	1,8—2,0	2,2—3,5	1,7—2,2
лизина	0,83	0,41	0,61	0,92	1,9	0,93	0,83	0,98
метионина и цистина (в сумме)	0,71	0,32	0,66	0,87	0,83	0,92	0,96	0,94

Примечания. 1. В зерносмесь для птиц и овец БВМД рекомендуется вводить до 30 %, для свиней и крупного рогатого скота — до 20%.
2. Массовая доля сырого протеина в АВМД представляет собой сумму белкового и небелкового азота.

Внешний вид и цвет БВМД и АВМД должны быть без следов плесени и соответствовать внешнему виду и цвету применяемых компонентов. Запах должен быть свойствен для БВМД и АВМД, без затхлости, гнилостности и других признаков недоброкачественного продукта.

Массовая доля влаги в добавках не должна превышать 12 %. Остатков на сите с отверстиями диаметром 5 мм не больше 5 %, а с отверстиями 3 мм — 10 %. Наличие целых зерен в добавках не должно превышать 0,5 %, а при вводе в рецепт хлопкового шрота — до 15 %.

Содержание витаминов и микроэлементов в добавках должно соответствовать рецептурному составу используемого премикса с учетом его количества, вводимого в БВМД и АВМД. Уровень ввода премикса в добавки устанавливают исходя из нормы ввода добавки в зерносмесь.

Содержание металломагнитной примеси размером до 2 мм включительно в добавках не должно превышать 30 мг/кг, золы, нерастворимой в соляной кислоте, — 2 %, нитратов и нитритов — 500 и 10 мг/кг соответственно, зараженность БВМД и АВМД вредителями хлебных запасов — не более 5 экз. в 1 кг, а наличие патогенной микрофлоры не допускается.

Комбикормовое сырье, используемое для изготовления БВМД и АВМД, должно соответствовать требованиям нормативных документов. Массовую долю сырой клетчатки, кальция, фосфора, натрия, лизина, метионина и цистина в добавках определяют периодически, но не реже чем 1 раз в 15 дней, а также при смене партий используемого сырья по методикам, установленным определенными ГОСТами.

Срок хранения БВМД и АВМД — 2 мес со дня изготовления. АВМД, в состав которых входит карбамид, рекомендуется вводить в таком количестве, чтобы массовая доля карбамида в комбикорме не превышала 2,5 %.

Хозяйства, имеющие наряду с фуражным зерном белковое сырье, могут вводить добавок меньше, определяя количество их в каждом конкретном случае.

Скармливать животным БВМД и АВМД в чистом виде не допускается.

7.1.13. ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ПРЕМИКСОВ

Премиксы — однородные смеси измельченных до необходимой крупности микродобавок (микроэлементов, витаминов и других биологически активных веществ) и наполнителя. Внешний вид, цвет и запах их должны быть свойственны применяемому наполнителю и набору БАВ без постороннего запаха (плесени, затхлости и др.). По показателям безопасности премиксы должны соответствовать требованиям ГОСТ Р 51095—97 (табл. 56).

56. Требования ГОСТ Р 51095—97 к премиксам

Показатель	Нормы для премиксов, вырабатываемых на основе				Требования
	измельченного зерна и продуктов его переработки (мука, отруби)	жмыхов и шротов	кормовых дрожжей, кормового концентрата, L-лизина, биотрина, белотина	известняковой муки, дикальций-фосфата, цеолита, бентонита	
Массовая доля влаги, %, не более	13,0	10,0*	10,0*	6,0	ГОСТ 13496.3
Содержание металломагнитной примеси:					
частиц размером до 2 мм включительно, мг/кг, не более	100	100	100	100	ГОСТ 13496.9
частиц с острыми краями и размером более 2 мм	Не допускается				То же
Зараженность вредителями хлебных запасов не более, экземпляров в 1 кг	5	—	—	—	ГОСТ 13496.13
Наличие живых клеток продуцента	Не допускается				ГОСТ 20083
Наличие сальмонелл, КОЕ** в 25 г продукта	То же				НД МЗ СССР и ГУВ, 1990
Наличие энтеропатогенных типов кишечной палочки, КОЕ в 1 г продукта	»				НД ГВУ МСХ СССР, 10.06.75

* Для премиксов, выпускаемых на основе биотрина и белотина, допускается массовая доля влаги не более 12%, на основе цеолита — не более 10 %, на основе бентонита — не более 8 %.

** Колониеобразующие единицы.

Крупность премиксов должна соответствовать требованию: остаток на сите с сеткой № 1,2 — не более 5 %. Допустимое отклонение содержания витаминов от предусмотренных по рецепту — не более 15 %.

В рецептах премиксов, содержащих жидкий холинхлорид в количестве 50 кг и более на 1 т, допускается снижение суммарной активности витамина А после первого месяца хранения на 25%, после двух и более месяцев — не более 20 %.

Для производства премикса применяют БАВ, разрешенные к вводу в корма МСХ РФ, а сырье, используемое для производства

премиксов, должно соответствовать требованиям действующих нормативных документов.

Содержание токсичных элементов, нитратов, нитритов, микотоксинов, пестицидов и радионуклидов в сырье, используемом для производства премиксов, не должно превышать норм, установленных в стандартах, а при отсутствии таковых — не более норм, утвержденных Департаментом ветеринарии МСХ РФ.

Контроль за содержанием в премиксах витаминов проводят периодически, но не реже 1 раза в квартал в каждой 10-й партии соответствующего премикса.

Контроль за наличием в премиксах сальмонелл и кишечной палочки энтеропатогенных типов осуществляется в соответствии с порядком, установленным производителем продукции по согласованию с территориальными органами государственного ветеринарного надзора и гарантирующим безопасность продукции.

Премиксы подлежат сертификации в установленном порядке. Вводятся в состав белково-витаминных добавок, комбикормов и кормовых смесей в соответствии с нормами и рекомендациями МСХ РФ.

7.2. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА КОРМОВ

Объективность оценки кормов химическими методами зависит от трех важнейших факторов: а) правильности отбора средней пробы кормов и подготовки ее к анализу; б) выбора методики (метода) и в) техники и аккуратности выполнения самого химического анализа.

Методы отбора проб для анализа (ГОСТ 27262—87). По химическому составу и основным свойствам средняя проба должна быть по возможности точной копией всей партии кормов. Под партией понимают любое количество корма, изготовленного по одному рецепту или технологии, предназначенное к одновременной приемке, отгрузке, сдаче или хранению.

Точечная (разовая) проба — небольшое количество корма, отобранное от одной партии или площади пастбища, или сенокосных угодий, кормушек. Точечные пробы берут вручную не менее чем из 10 разных мест порциями по 400—500 г.

Объединенная проба — совокупность точечных проб после тщательного перемешивания и расстилания ровным слоем на пологе (1,5—2 кг).

Средняя проба — отбирают из объединенной из 10 различных мест в количестве, чтобы средняя проба для анализа составляла для зеленых кормов (травы) 1,5—2,0 кг, для сена 1, для силоса и сенажа 0,5—1,0, для травяной муки 1, для гранул и брикетов 2, для корнеплодов 6—8, для картофеля 4—5, для зерновых кормов 2, для жмыхов, шротов и дрожжей 2—2,5 кг, для корма животного происхождения 100—150 г, для кормового жира 0,5 кг, для сухих кормовых добавок 0,5, для жидких кормов (барда, мезга, патока, жом и др.)

1,5—2 кг, для молока 250—500 мл. Средние пробы, направляемые на анализ, помещают в полиэтиленовые пакеты или герметически закрывающиеся банки и сопровождают соответствующей информацией.

Перед отправкой на анализ силос помещают в пакет из плотного полиэтилена или стеклянную банку с плотно закрывающейся крышкой, добавляют 5 мл консерванта (смесь хлорофора и толуола 1:1) и доставляют в лабораторию в течение 24 ч. До анализа силос хранят в холодильнике не более 3 дней. Молоко консервируют 40%-ным раствором формальдегида из расчета 1—2 капли на 100 мг молока, или 10%-ным раствором калия двухромовокислого из расчета 1 мл на 100 мл молока (если не определяют в молоке золу и минеральные вещества).

Подготовка проб кормов к анализу (ГОСТ Р 51419—99). Важно, чтобы поступающая в лабораторию проба была действительно представительной, не поврежденной и не претерпевшей изменений при транспортировке или хранении.

Из средних проб кормов, поступивших в лабораторию, следует немедленно взять лабораторную пробу и определить в ней первоначальную воду (влагу). Перед взятием образца для высушивания средние пробы кормов (измельченное сено, силос, зерновые и мучнистые корма и др.) перемешивают и делят общепринятым способом (квартованием) до тех пор, пока масса корма не будет равна 150—200 г для зерновых и 300—500 г для влажных кормов.

Перед определением первоначальной воды жмыхи необходимо раздробить. Корнеплоды отмывают от земли и вытирают сухим полотенцем. От каждого корня средней пробы отрезают вдоль половину, 1/4 или 1/8 часть (это зависит от величины средней пробы). Масса образца для анализа должна составлять 1000—1200 г.

7.2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ВОДЫ (ГОСТ 13496.3—92)

Принцип. Метод основан на испарении воды в процессе высушивания корма в сушильном шкафу (термостате) при температуре 60—65 °С.

Оборудование: сушильный шкаф или термостат; нож для измельчения сена, силоса и других кормов; технические весы с разновесами; эмалированные кюветы или фарфоровые чашки диаметром 20—30 см.

Ход определения. Кюветы или чашки нумеруют, высушивают в течение 30 мин при 90—100 °С, охлаждают и взвешивают; массу записывают. В кювету помещают указанное количество анализируемого корма и вновь взвешивают на тех же весах. Кюветы с кормом помещают в сушильный шкаф и выдерживают в нем при температуре 60—65 °С 1,5—2 ч, затем вынимают и охлаждают на воздухе, взвешивают и вновь помещают в сушильный шкаф. Так

поступают до тех пор, пока разница между двумя последними взвешиваниями не будет превышать 0,5 г.

При определении первоначальной влаги в корнеклубнеплодах отобранные экземпляры режут поперек на тонкие пластинки, которые нанизывают на предварительно взвешенные стеклянные палочки или на нитку и взвешивают. Навеску помещают в сушильный шкаф и выдерживают при температуре 90 °С в течение 30—60 мин, чтобы прекратить ферментные процессы. Высушивание продолжают при температуре 60—65 °С. Далее поступают, как описано выше.

Первоначальную влагу в зернах, отрубях, муке, жмыхах и других сухих кормах определяют так же, как и в грубых кормах.

Не рекомендуется одновременно ставить в сушильный шкаф корма, резко отличающиеся по содержанию воды (например, сено, концентраты и сочные).

После высушивания корм для приведения исследуемого образца в воздушно-сухое состояние оставляют на 4—6 ч в кювете, прикрыв его листом бумаги, и взвешивают. Это необходимо для того, чтобы при хранении образца содержание воды в корме в дальнейшем не изменялось и не вносило ошибки при взятии навесок для анализа.

Расчет влажности проводят путем вычитания результата последнего взвешивания из результата определения массы кюветы с кормом до высушивания. Первоначальную влажность (x) в процентах рассчитывают по формуле

$$x = (m_1 \cdot 100)/m,$$

где m_1 — масса испарившейся воды, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты; m — масса навески корма, взятая для анализа.

Измельчение кормов. Полученную воздушно-сухую пробу корма измельчают на лабораторных мельницах, просеивают через миллиметровое сито. Частицы, оставшиеся на сите, снова размалывают и просеивают. Так поступают до тех пор, пока остаток не будет превышать 2 % массы образца.

Остаток примешивают к основному образцу. Измельченный образец помещают для хранения в банку с плотно закрывающейся пробкой. Банку заполняют кормом не более чем наполовину ее объема (чтобы при взятии навески можно было бы хорошо перемешать образец).

На банку наклеивают этикетку с названием корма и порядковым номером согласно регистрационному журналу. Измельченный корм является исходным материалом для всех последующих анализов.

7.2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГИГРОСКОПИЧЕСКОЙ ВОДЫ

Принцип. Корм, приведенный в воздушно-сухое состояние, содержит некоторое количество связанной воды, называемой гигроскопической, которую определяют высушиванием навески при температуре 100—105 °С до постоянной массы.

Оборудование: аналитические весы с разновесами; сушильный шкаф или термостат; бюксы с притертой крышкой пронумерованные; эксикатор; ложка для взятия кормов.

Ход определения. Бюксу с положенной на ребро крышкой высушивают в термостате в течение 30—40 мин при температуре 100—105 °С. Затем ее закрывают и ставят в эксикатор для охлаждения и взвешивают на аналитических весах. Насыпают в нее 2—3 г воздушно-сухого корма, закрывают и взвешивают. По разнице между взвешиваниями находят массу корма, взятую для анализа. Затем бюксу с кормом (крышку положить на ребро) помещают в термостат, нагретый до температуры 120—130 °С, и выдерживают там 3 ч при температуре 100—105 °С.

После этого бюксу закрывают крышкой, вынимают из термостата, ставят в эксикатор, охлаждают в течение 30—40 мин, взвешивают. Количество испарившейся воды находят по разнице между массой бюксы и кормом после высушивания. Количество гигроскопической воды (x_1) в процентах рассчитывают по формуле

$$x_1 = (m_1 \cdot 100)/m,$$

где m_1 — масса воды, испарившейся из навески корма, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты; m — масса корма в воздушно-сухом состоянии, г.

Общее содержание воды (y) в процентах рассчитывают на основании результатов определения первоначальной и гигроскопической воды по формуле

$$y = x + x_1(100 - x) \cdot 100,$$

где x_1 — процент гигроскопической воды; x — процент первоначальной воды; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Полученные результаты записывают по форме для определения в корме воды (гигроскопической и общего количества):

Показатель	*Определение*	
	первое	второе
Масса бюксы с навеской корма, г		
Масса пустой бюксы, г		
Масса навески корма, г		
Масса бюксы с веществом после высушивания образца при 100—105 °С, г		
Масса испарившейся воды, г		
Содержание гигроскопической воды в воздушно-сухом веществе, %		
Общее содержание воды в исследуемом корме, %		
Содержание в корме сухого вещества, %		

ГОСТ 13496.3—92 предусматривает ускоренные варианты определения влажности кормов.

Определение общего количества воды в кормах путем высушивания в малогабаритном электросушильном шкафу при температуре 130 °С (экспресс-метод). В предварительно высушенные до посто-

янной массы бюксы или металлические чашки берут две навески измельченного корма массой около 5 г каждая, взвешивают с точностью до 0,01 г. Корм рассыпают тонким слоем по дну бюксы или чашки. Открытые бюксы и крышки от них помещают в электросушильных шкаф, предварительно подогретый до 130 ± 2 °С. Высушивание продолжается 40 мин, считая с момента фиксации температуры. По истечении 40 мин бюксы вынимают из сушильного шкафа тигельными щипцами, быстро закрывают крышкой и ставят в эксикатор на 20—30 мин, охлаждают до комнатной температуры. Эксикатор должен быть заправлен концентрированной серной кислотой или прокаленным кальция хлоридом.

После охлаждения бюксы с кормом снова взвешивают и по разности массы до и после высушивания определяют содержание влаги.

Определение общего содержания влаги в кормах влагомером Чижовой. Прибор состоит из блока высушивания, имеющего вид двух металлических плит, и блока автоматической регуляции температуры.

Подготовленные из фильтровальной бумаги пакеты закладывают между нагревательными плитами прибора и выдерживают при температуре 160 ± 2 °С в течение 3 мин. Затем пакет помещают на 3 мин в эксикатор для охлаждения и взвешивают. В подготовленные таким образом пакеты берут две навески по 5 г каждая, взвешивают с точностью до 0,01 г. Корм в пакете распределяют тонким слоем, обеспечивающим правильное обезвоживание, и помещают на 5 мин в предварительно нагретый до 160 ± 2 °С прибор. Затем пакеты вынимают из прибора, охлаждают в эксикаторе и взвешивают на технических весах.

Содержание влаги (W) в процентах в исследуемом корме вычисляют по формуле

$$W = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m},$$

где m_1 — масса бюксы до высушивания, г; m_2 — масса бюксы с навеской после высушивания, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты; m — масса пустой бюксы.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух определений. Допускаемые расхождения при параллельных определениях не должны превышать ±0,2 %.

Источник: 24.

7.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АЗОТА И СЫРОГО ПРОТЕИНА ПО КЪЕЛЬДАЛЮ (ГОСТ Р 51417—99 (ИСО 5983—97))

Принцип. Метод заключается в разрушении органического вещества серной кислотой в присутствии катализатора, высвобождении продукта реакции щелочью, в отгонке и титровании выделяющегося аммония, вычислении содержания азота, умножении результата на коэффициент 6,25 для определения содержания сырого протеина.

Реактивы: калия сульфат (х. ч., ч. д. а);

катализаторы: меди (II) оксид (CuO) или меди (II) сульфат 5-водный ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$);

серная кислота молярной концентрации $c(H_2SO_4) = 18$ ммоль/дм^3, $\rho(H_2SO_4) = 1{,}84$ г/см^3;

парафиновая смола;

сахароза;

стандартные вещества: ацетанилид [точка плавления 114 °С, содержание азота (N) 103,6 г/кг] или триптофан [точка плавления 282 °С, содержание азота (N) 137,2 г/кг]. Перед использованием триптофан высушивают;

раствор натрия гидроксида массовой доли 33%;

поглощающие жидкости: серная кислота, стандарт-титр, молярной концентрации $c(H_2SO_4) = 0{,}05$ ммоль/дм^3 или $c(H_2SO_4) = 0{,}125$ моль/дм^3; борная кислота массовой концентрации $\rho(H_3BO_3) = 40$ г/дм^3;

растворы для титрования: натрия гидроксид, стандарт-титр, молярной концентрации $c(NaOH) = 0{,}1$ моль/дм^3 или $c(NaOH) = 0{,}25$ моль/дм^3;

смешанный индикатор, интервал перехода при pH 4,4 до 5,8. Растворяют 2 г метилового красного и 1 г метиленового голубого в 1000 см^3 95%-ного этанола;

лакмусовая бумага;

вещества, предотвращающие выбрасывание жидкости (кусочки пемзы, стеклянные шарики диаметром от 5 до 7 мм или стружка карборунда, промытые кислотой хлористоводородной и дистиллированной водой и прокаленные).

Оборудование: обычная лабораторная аппаратура; установки для сжигания, отгонки и титрования; весы аналитические или лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г.

Пробы отбирают по ГОСТ 27262—87, а подготавливают по ГОСТ Р 21419—99.

Ход определения. Навеску воздушно-сухих проб массой от 0,5 до 2,0 г, а влажных и (или) неоднородных проб от 2,5 до 5,0 г переносят в колбу Кьельдаля соответствующей вместимости (обычно 800 см^3). Добавляют 15 г калия сульфата и катализатора: 0,3 г меди II оксида или от 0,9 до 1,2 г 5-водной меди сульфата. Добавляют 25 см^3 серной кислоты для первого грамма сухого вещества навески и от 6 до 12 см^3 для каждого дополнительного грамма сухого вещества. Тщательно перемешивают, чтобы полностью смочить навеску.

Колбу устанавливают наклонно под углом 30—40° к вертикали. Во время нагревания колба должна находиться в этом положении (под вытяжным шкафом!). Сначала ее нагревают умеренно, чтобы предотвратить поднятие пены до горла колбы или выбрасывания ее из колбы.

Примечания. 1. Желательно добавить в колбу антипенообразовывающие вещества, например парафиновую смолу. 2. Блок для сжигания является аппаратом, обеспечивающим равномерное нагревание разлагаемой смеси.

Нагревают умеренно, время от времени поворачивая колбу до тех пор, пока не исчезнет пена. Затем нагревание усиливают, пока не установится равномерное кипение. Нагревание считается достаточным, если кипящая серная кислота конденсируется в середине колбы Кьельдаля.

Следует избегать перегрева стенок колбы, находящихся в контакте с жидкостью. Если используют открытое пламя, такой перегрев можно предотвратить путем установления колбы на лист асбеста с отверстием, диаметр которого немного меньше диаметра колбы на уровне жидкости.

После осветления жидкости до светлого зелено-голубого цвета колбу нагревают еще в течение 2 ч. Оставляют остывать. Если минерализат начинает застывать, добавляют немного дистиллированной воды и перемешивают круговыми движениями. Осторожно добавляют в колбу 250—300 $см^3$ дистиллированной воды для полного растворения сульфатов. При необходимости ускоряют растворение путем нагревания колбы в теплой воде. Перемешивают круговыми движениями и оставляют остывать. Затем добавляют немного вещества, предотвращающего выбрасывание при отгонке аммиака.

В приемную колбу отгонного аппарата приливают 25 $см^3$ серной кислоты, выбирая ее концентрацию в зависимости от ожидаемого содержания азота в навеске. Добавляют от 100 до 150 $см^3$ дистиллированной воды и несколько капель смешанного индикатора.

При отгонке с борной кислотой в приемную колбу переносят от 100 до 250 $см^3$ борной кислоты и добавляют несколько капель смешанного индикатора. (Рекомендуется непрерывно титровать аммоний во время отгонки, так как это позволяет уточнить конец дистилляции.)

Кончик трубки холодильника погружают на глубину не менее 1 см в жидкость, содержащуюся в приемной колбе. Медленно по стенке в отгонную колбу вводят 100 $см^3$ раствора натрия гидроксида.

Колбу немедленно присоединяют к отгонному аппарату и нагревают с такой интенсивностью, чтобы за 30 мин собрать около 150 $см^3$ дистиллята. По истечении этого времени лакмусовой бумагой проверяют pH дистиллята на кончике холодильника. Если реакция щелочная (бумага синеет), отгонку продолжают.

Кончик трубки холодильника сразу после окончания дистилляции вынимают из жидкости, чтобы предотвратить обратное засасывание.

Если в качестве поглощающей жидкости использовалась серная кислота, избыток серной кислоты в приемной колбе титруют рас-

твором натрия гидроксида соответствующей концентрации $c(NaOH) = 0{,}1$ моль/дм^3 или $c(NaOH) = 0{,}25$ моль/дм^3 до конечной точки, определяемой на pH-метре или по изменению окраски раствора из зеленой в фиолетовую.

Если в качестве поглощающей жидкости использовалась борная кислота, аммоний титруют серной кислотой соответствующей концентрации $c(H_2SO_4) = 0{,}05$ моль/дм^3 или $c(H_2SO_4) = 0{,}125$ моль/дм^3 до конца титрования, определяемого при помощи pH-метра или по изменению окраски раствора из зеленой в фиолетовую.

Одновременно проводят холостое определение, используя вместо навески около 1 г сахарозы.

Контрольный анализ проводят путем определения содержания азота в ацетанилиде или триптофане, добавляя 1 г сахарозы. Выбор вещества для контрольного анализа зависит от того, насколько легко озоляются испытуемые пробы. Ацетанилид озоляется легко, в то время как триптофан сжигается труднее. Обнаружение азота ацетанилида должно составлять не менее 99,5 % и триптофана — не менее 99,0 %.

Вычисление массовой доли азота. Отгонка аммиака в серную кислоту. Если для поглощения аммиака при анализе испытуемой пробы и холостом определении взяты одинаковые объемы серной кислоты, массовую долю азота в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$W_{N1} = \frac{(V_0 - V_1) C_1 M}{m},$$

где W_{N1} — массовая доля азота, г/кг; V_0 — объем раствора натрия гидроксида, использованный для титрования при холостом определении, см^3; V_1 — объем раствора натрия гидроксида, использованный для титрования при анализе пробы, см^3; C_1 — концентрация раствора натрия гидроксида, использованного для титрования, моль/дм^3; M — молярная масса азота, г/моль ($M = 14$ г/моль); m — масса навески, г.

Отгонка аммиака в борную кислоту. Массовую долю азота в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$W_{N2} = \frac{(V_3 - V_2) C_2 M}{m},$$

где W_{N2} — массовая доля азота, г/кг; V_3 — объем серной кислоты, использованный для титрования при анализе пробы, см^3; V_2 — объем серной кислоты, использованный для титрования при холостом определении, см^3; C_2 — концентрация серной кислоты, использованной для титрования, моль/дм^3; M — молярная масса азота, г/моль ($M = 14$ г/моль); m — масса навески, г.

Вычисление массовой доли сырого протеина. Массовую долю сырого протеина в испытуемой пробе вычисляют по формуле

$$W_n = 6{,}25 \cdot W_N,$$

где W_n — массовая доля сырого протеина, г/кг; 6,25 — коэффициент пересчета в сырой протеин; W_N — массовая доля азота в испытуемой пробе (W_{N1} или W_{N2}), г/кг.

Результаты вычисляют до третьего знака и округляют до второго.

7.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЫРОЙ КЛЕТЧАТКИ (ГОСТ 13496.2—91)

Принцип. Метод заключается в обработке навески испытуемого продукта смесью концентрированной азотной и 80%-ной уксусной кислот, промывании остатка водой, спиртом, эфиром и последующем высушивании.

Реактивы: кислота азотная по ГОСТ 4461—77 плотностью 1,4 г/см^3;

кислота уксусная ледяная по ГОСТ 61—75;

спирт этиловый по ГОСТ 5962—67 или спирт технический (гидролизный) по ГОСТ 17289—78;

эфир этиловый;

фильтры бумажные диаметром 7,5—9,5 см или бумага фильтровальная по ГОСТ 1226—76.

Оборудование: весы аналитические; мельница лабораторная марки ЛЗМ; шкаф сушильный; насос электровакуумный с разрежением 13 Па или насос Камовского; плитка электрическая; асбест листовой; сито с отверстиями диаметром 1 мм; пластинка металлическая с отверстиями диаметром 2—4 мм; холодильник воздушный обратный со шлифом (стеклянная трубка длиной 25—30 см с внутренним диаметром 5—10 мм); колба Бунзена с тубусом вместимостью 0,5—1 л; воронка Бюхнера № 4 или 5 по ГОСТ 9147—73; пинцет; промывалка; бюксы стеклянные по ГОСТ 7148—70 или алюминиевые диаметром 4—6 см и высотой 4—5 см с крышками; колбы конические плоскодонные со шлифом диаметром 3 см вместимостью100 мл по ГОСТ 10394—72.

Подготовка к испытанию:

приготовление 80%-ного раствора уксусной кислоты: 800 мл ледяной уксусной кислоты переносят в мерную колбу на 1000 мл и доводят дистиллированной водой до метки;

приготовление реактивной смеси: смешивают два объема азотной кислоты с девятью объемами 80%-ной уксусной кислоты;

подготовка установок для гидролиза и фильтрования. Установку для гидролиза и фильтрования собирают в соответствии с рисунками 9 и 10;

навеску корма измельчают на мельнице и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Ход определения. Навеску массой 1—1,5 г для сочных и грубых кормов, 2 г для концентратов взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г на аналитических весах и переносят в коническую колбу на 100 мл. Осторожно по стенкам колбы приливают 40 мл реактивной смеси. К колбе присоединяют воздушный холодильник со шлифом и ставят на этернитовую или обычную электроплиту с обечайкой, накрытой металлической пластинкой с отверстиями. Все операции, связанные с гидролизом, фильтрованием и промыванием, проводят в вытяжном шкафу. Гидролиз выполняют при слабом равномерном кипячении в течение 30 мин, считая от на-

чала кипения реактивной смеси. При сильном кипении под колбу подкладывают слой асбеста.

По окончании гидролиза холодильник отделяют от колбы, содержимое колбы в горячем состоянии фильтруют через бумажный фильтр, помещенный в воронку Бюхнера.

Бумажный фильтр с бюксой должны быть заранее просушены в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 10 мин и взвешены.

Установка для гидролиза (рис. 9) состоит из этернитовой электроплитки, колбы и воздушного холодильника. Вместо этернитовой электроплитки допускается применять обычную с цилиндрической обечайкой из жести. Сверху накрывают металлической пластинкой с отверстиями. На пластинку помещают колбу с воздушным холодильником, обеспечивающим постоянство концентрации гидролиза.

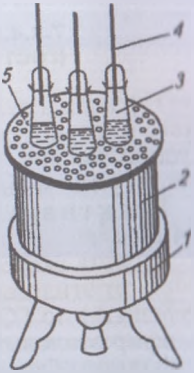


Рис. 9. Установка для гидролиза:
1 — электроплитка; *2* — обечайка цилиндрическая из жести; *3* — колба Эрленмейера; *4* — воздушный холодильник; *5* — металлическая пластинка с отверстиями

Установка для фильтрования (рис. 10) состоит из колбы Бунзена, воронки Бюхнера и вакуумного насоса.

Колбу Бунзена закрывают просверленной резиновой пробкой, в которую вставляют воронку Бюхнера. При помощи резиновой трубки колбу соединяют с вакуумным насосом. На дно воронки Бюхнера помещают фильтр, который смачивают дистиллированной водой. Включают насос и, после того как фильтр хорошо присосется к воронке, приступают к фильтрованию.

Колбу промывают 3—4 раза горячей водой и смывные воды переносят на фильтр. Для удаления остатка реакционной смеси осадок на фильтре промывают горячей водой до исчезновения запаха уксусной кислоты. Затем осадок на фильтре промывают 1 мл спирта и 10 мл эфира и выключают насос.

Фильтр с клетчаткой захватывают пинцетом, складывают вчетверо, переносят во взвешенную бюксу, подсушивают на воздухе и

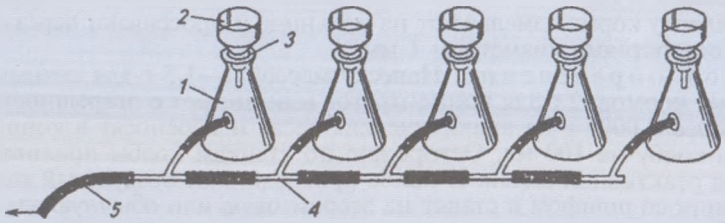


Рис. 10. Установка для фильтрования:
1 — колба Бунзена; *2* — воронка Бюхнера; *3* — резиновая пробка; *4* — стеклянные тройники; *5* — резиновая трубка

сушат в сушильном шкафу при температуре 160 °С в течение 15 мин. Высушенную бюксу с клетчаткой охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Содержание сырой клетчатки (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100,$$

где m_1 — масса бюксы с клетчаткой и фильтром, г; m_2 — масса бюксы с фильтром, г; m — масса навески корма, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Содержание сырой клетчатки в пересчете на абсолютно сухое вещество (x_1) в процентах вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{x}{100 - W} \cdot 100,$$

где x — содержание сырой клетчатки, %; W — содержание влаги в испытуемом корме, %; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Допускаемые расхождения между результатами параллельных определений не должны превышать ±0,15 абс.%, а между контрольными анализами ±0,25 абс.%.

Источник: 24.

7.2.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОЙ ЗОЛЫ (ГОСТ 13979.6—69)

Принцип. Под общей сырой золой понимают прокаленный минеральный остаток, полученный в результате сжигания пробы корма. Под золой, нерастворимой в 10%-ной соляной кислоте, понимают остаток от общей золы, полученный после обработки ее этой кислотой при кипячении.

Метод определения содержания общей золы. Реактивы: 10%-ный раствор кислоты хлористоводородной по ГОСТ 3118—77; 0,1 н. раствор серебра нитрата по ГОСТ 1277—75.

Оборудование: печь муфельная; сушильный электрошкаф с терморегулятором; весы аналитические; электроплитки; измельчитель механический или ступка фарфоровая по ГОСТ 9147—73 или бронзовая; сито металлическое штампованное с отверстиями диаметром 1 мм; механический рассев Журавлева; тигли фарфоровые; стаканы стеклянные низкие вместимостью 250 мл по ГОСТ 10394—772; цилиндры мерные по 50 мл по ГОСТ 1770—74; воронки стеклянные для фильтрования диаметром 4—5 см по ГОСТ 8613—75; эксикатор по ГОСТ 6371—73; промывалки стеклянные.

Ход определения. Навеску воздушно-сухого и измельченного корма около 1—5 г, взятую с точностью до 0,0002 г, сжигают

до полного озоления в предварительно прокаленном и взвешенном на аналитических весах тигле. Сначала сжигание производят осторожно, избегая загорания корма. Для этого тигель помещают на электроплитку, покрытую асбестом. После прекращения выделения паров и газов нагревание усиливают, асбест удаляют и продолжают прокаливать до полного исчезновения частиц угля.

Прокаливание остатка заканчивают в муфельной печи. Температура прокаливания не должна превышать температуру темно-красного каления (600—700 °С). После прокаливания в течение 2 ч тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Прокаливание повторяют до получения постоянной массы. Продолжительность повторного прокаливания 30 мин.

Содержание золы (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_1 - m_2}{m - m_2} \cdot 100,$$

где m_1 — масса тигля с золой, г; m_2 — масса пустого тигля, г; m — масса тигля с навеской до прокаливания, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Содержание золы в пересчете на абсолютно сухое вещество (x_1) в процентах вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{x \cdot 100}{100 - W},$$

где x — содержание золы, %; W — содержание влаги в испытуемом корме, %; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух определений. Допускаемые расхождения при параллельных определениях не должны превышать ±0,05%.

Метод определения содержания золы, нерастворимой в 10%-ной соляной кислоте. Ход определения. Тигель с прокаленным остатком, полученным при определении общей золы, помещают наклонно в стеклянный стакан на 250 мл и обливают 25 мл 10%-ной кислотой хлористоводородной. Содержимое стакана доводят до кипения и оставляют стоять в течение 5 мин. Тигель вынимают пинцетом и ополаскивают над стаканом дистиллированной водой из промывалки.

Содержимое стакана фильтруют через беззольный фильтр диаметром 7—8 см, сливают жидкость тонкой струей по стеклянной палочке. Стакан и палочку промывают горячей водой, чтобы нерастворившаяся зола была вся без потерь перенесена на фильтр. Фильтр промывают горячей водой до тех пор, пока промывные воды не перестанут давать муть с раствором серебра нитрата. Края фильтра загибают пинцетом внутрь, фильтр переносят в прокаленный и взвешенный тигель и высушивают в сушильном шкафу. Сжигание и прокаливание до полного озоления проводят, как указано выше.

Содержание золы, нерастворимой в 10%-ной кислоте хлористоводородной (x_2), в процентах вычисляют по формуле

$$x_2 = \frac{m_1 - m_2}{m - m_2} \cdot 100,$$

где m_1 — масса тигля с нерастворимой золой, г; m_2 — масса пустого тигля, г; m — масса тигля с навеской до озоления, взятой для определения общей золы; г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Содержание золы, нерастворимой в 10%-ной кислоте хлористоводородной, в пересчете на абсолютно сухое вещество (x_3) в процентах вычисляют по формуле

$$x_3 = \frac{x_2 \cdot 100}{100 - W},$$

где x_2 — содержание золы, нерастворимой в 10%-ной кислоте хлористоводородной, %; W — содержание влаги в испытуемом корме, %; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух определений.

Допустимые расхождения при параллельных определениях не должны превышать ±0,05%.

7.2.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАЛЬЦИЯ (ГОСТ 17258—71)

Принцип. Метод основан на осаждении кальция раствором аммония оксалата. Выделенный и отмытый осадок кальция оксалата растворяют в серной кислоте. Освободившуюся при этом щавелевую кислоту титруют раствором калия перманганата.

Реактивы: концентрированная кислота хлористоводородная по ГОСТ 3118—77;

2 н. раствор кислоты хлористоводородной по ГОСТ 3118—77;

10%-ный раствор аммиака водного по ГОСТ 3760—64;

1%-ный раствор аммиака водного по ГОСТ 3760—64;

1 н. раствор кислоты серной по ГОСТ 4204—77;

кислота серная по ГОСТ 4204—77, разведенная дистиллированной водой в соотношении 1:8;

10%-ный раствор кислоты уксусной по ГОСТ 61—75;

10%-ный раствор кальция хлорида;

насыщенный раствор аммония оксалата по ГОСТ 5712—78;

индикатор — метиловый красный по ГОСТ 5853—51;

0,1 н. раствор калия перманганата по ГОСТ 20490—75 (х. ч.): 3,165 г $KMnO_4$ в 1000 $см^3$ дистиллированной воды;

кислота щавелевая по ГОСТ 2218—76 (х. ч.);

вода дистиллированная по ГОСТ 6702—72.

Оборудование: муфельная печь; водяная баня; центрифуга с частотой вращения 3000 мин$^{-1}$; тигли по ГОСТ 9147—73; колбы мерные по ГОСТ 1770 вместимостью 100 и 1000 мл; воронки диаметром 5—7 см по ГОСТ 8613—75; пробирки центрифужные по ГОСТ 10515—75 вместимостью 1,0 и 25 мл; эксикатор по ГОСТ 6371—73; палочки стеклянные; бумага универсальная индикаторная; фильтры обеззоленные диаметром 5—7 см.

Ход определения. Навеску рыбной или мясокостной муки массой 1,0—1,5 г или 3,0—4,0 г сырья, или другого корма отвешивают с точностью до 0,0001 г в предварительно прокаленный до постоянной массы фарфоровый тигель и сжигают до полного озоления. Сначала сжигают в муфельной печи при 200—300 °С, так как проба при нагревании при более высокой температуре может вспучиться. Окончательное озоление проводят в муфельной печи при температуре выше 550 °С (темно-красное каление). По окончании озоления тигель помещают в эксикатор и взвешивают. Прокаливание повторяют до получения постоянной массы.

В охлажденный тигель с навеской золы вносят 5 см^3 2 н. раствора кислоты хлористоводородной и помещают в кипящую водяную баню. Содержимое тигля тщательно перемешивают стеклянной палочкой, нерастворившимся частицам дают осесть на дно. Раствор осторожно по палочке сливают через маленький гладкий фильтр в мерную колбу на 100 мл. Обработку осадка в тигле повторяют 5 см^3 кислоты хлористоводородной еще раз. Тигель и воронку с фильтром 2—3 раза промывают горячей водой, подкисленной кислотой хлористоводородной (3 см^3 концентрированной кислоты на 1 л воды). Вытяжку в колбе охлаждают до комнатной температуры и доводят до метки дистиллированной водой. Указанные операции проводят в вытяжном шкафу.

5 см^3 вытяжки помещают в центрифужную пробирку и, добавляя в пробирку 8—10 капель 10%-ного раствора аммиака (по каплям), нейтрализуют кислоту хлористоводородную. Ориентироваться следует по изменению окраски прибавляемого в раствор индикатора метилового красного или универсальной индикаторной бумаги. Перемешивают содержимое до выпадения осадка, вращая пробирку между ладонями. Осадок полностью растворяют 10%-ным раствором уксусной кислоты (около 1 см^3), прибавляя его по каплям. Полученный прозрачный раствор обрабатывают по каплям 1 см^3 насыщенного раствора аммония оксалата. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют стоять не менее 2 ч для полного осаждения кальция оксалата. После чего центрифугируют (3000 мин$^{-1}$) в течение 15 мин. Жидкость над осадком сливают, не взмутив осадка. К осадку приливают 1,5—2,0 см^3 1%-ного раствора аммиака и после перемешивания снова центрифугируют в течение 10 мин. Прозрачную жидкость над осадком сливают. Оса-

док кальция оксалата промывают 5 см^3 1%-ного раствора аммиака, содержимое пробирки центрифугируют, жидкость над осадком сливают.

Промывку повторяют трехкратно, после чего проверяют полноту удаления аммония оксалата путем добавления нескольких капель 10%-ного раствора кальция хлорида к последней пробе промывной жидкости. В случае появления мути промывку осадка продолжают.

К промытому осадку добавляют 5 см^3 1 н. раствора серной кислоты и содержимое пробирки хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Не вынимая палочки, пробирку помещают в кипящую водяную баню для растворения осадка. Полученный прозрачный раствор в горячем состоянии титруют 0,1 н. раствором калия перманганата до слабого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Поправку к титру 0,1 н. раствора калия перманганата устанавливают следующим образом. Навеску щавелевой кислоты (6,3025 г), взятую с точностью до 0,0001 г, растворяют в 1 л дистиллированной воды. К 20 мл приготовленного 0,1 н. раствора приливают 3 см^3 серной кислоты, разведенной дистиллированной водой (1 : 8), нагревают на водяной бане до 90 °С и медленно титруют раствором калия перманганата до появления розового окрашивания.

Коэффициент пересчета (K) точно по 0,1 н. раствору калия перманганата вычисляют по формуле

$$K = \frac{a}{a_1},$$

где a — количество 0,1 н. раствора щавелевой кислоты или натрия оксалата, см^3; a_1 — количество раствора калия перманганата, израсходованного на титрование, см^3.

Содержание кальция (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{VK \cdot 0{,}002 \cdot 100 \cdot 100}{V_1 \cdot m},$$

где V — количество 0,1 н. раствора калия перманганата, израсходованного на титрование, см^3; K — коэффициент пересчета на точно по 0,1 н. раствору калия перманганата; 0,002 — количество кальция, соответствующее 1 см^3 0,1 н. раствора калия перманганата; 100 — объем солянокислой вытяжки, см^3; V_1 — объем солянокислой вытяжки из золы, взятой для определения кальция, мл; m — масса навески пробы, взятой для озоления, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,2%.

Источник: 24.

7.2.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ФОСФОРА (ГОСТ 26657—97)

Принцип. Сущность метода заключается в минерализации пробы способом сухого или мокрого озоления с образованием солей ортофосфорной кислоты и последующем фотометрическом определении фосфора в виде окрашенного в желтый цвет соединения — гетерополикислоты, образующейся в кислой среде в присутствии ванадат- и молибдатионов.

Реактивы: аммония молибдат (х. ч., ч. д. а.);

аммония ванадат мета (х. ч, ч. д. а);

кислота азотная (х. ч., ч. д. а);

вода дистиллированная;

кислота хлористоводородная (х. ч., ч. д. а) концентрированная и разбавленная дистиллированной водой 1:1;

калия фосфат однозамещенный (х. ч.);

пероксид водорода (х. ч., ч. д. а), раствор с массовой дозой 30 % и раствор, разбавленный дистиллированной водой 1:9;

кальция хлорид технический, прокаленный при температуре 250—300 °С в течение 2 ч.

Оборудование: измельчитель проб растений ИПР-2; мельница лабораторная МРП-2; сушильный шкаф лабораторный или сушилка проб кормов СК-1; сито с отверстиями диаметром 1 мм; ножницы; весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г; мезгообразователь МЛ-1; весы лабораторные 3-го и 4-го классов точности с наибольшим пределом взвешивания 500 г; спектрофотометр или ФЭК с максимумом светопропускания в области 440—465 нм; печь муфельная электрическая ПМ-8 или МР-64-0215 или других аналогичных типов; щипцы для тиглей муфельные; ступки фарфоровые с пестиком; тигли фарфоровые № 3 и 4; плитка электрическая с закрытой спиралью или другие аналогичных типов; эксикатор; пипетки градуированные или дозаторы той же вместимости с погрешностью дозирования не более 5 %; воронки стеклянные диаметром 36—56 мм; цилиндр мерный; стаканы или колбочки химические; колбы мерные; бюретки; стеклянные или пластмассовые банки вместимостью 250 $см^3$ с плотно закрывающимися пробками или крышками.

Примечание. Допускается использовать другую аппаратуру, мерную посуду, имеющую такие же или лучшие метрологические характеристики, а также реактивы по качеству не ниже отечественных.

Подготовка к испытаниям. Среднюю пробу сена, соломы, сенной резки и т. д. измельчают на отрезки длиной 1—3 см, корнеплоды разрезают на плоские ломтики толщиной до 0,8 см или измельчают на мезгообразователе. Измельченную пробу тщательно перемешивают и методом квартования выделяют среднюю пробу, масса которой после высушивания должна быть не менее 150 г. Высушивание проб проводят в сушильном шкафу при 60—65 °С до воздушно-сухого состояния. Затем пробу размалыва-

ют на лабораторной мельнице и просеивают через сито. Остаток на сите измельчают ножницами или в ступке, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Из средней пробы комбикормов, травяной муки, брикетов, гранул, жмыхов, шротов методом квартования выделяют не менее 150 г материала, размалывают без предварительного подсушивания и просеивают через сито. Остаток на сите растирают в ступке, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Объединенную пробу муки животного происхождения массой не менее 1,5 кг тщательно перемешивают. Для химического анализа муки из объединенной пробы отбирают 0,5 кг, тщательно перемешивают, высыпают на бумагу и разравнивают тонким слоем. Затем методом квартования выделяют пробу массой около 150 г, размалывают без предварительного подсушивания и просеивают через сито. Остаток на сите измельчают, добавляют к пробе и снова перемешивают. Пробы хранят в сухом месте в чистой стеклянной или пластмассовой банке с плотно закрывающейся крышкой или пробкой.

Приготовление растворов:

раствор № 1. Один объем концентрированной азотной кислоты разводят двумя объемами дистиллированной воды, перемешивают;

раствор № 2. 2,5 г аммония ванадат растворяют в нагретой до кипения дистиллированной воде, охлаждают, добавляют 20 $см^3$ концентрированной азотной кислоты и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 $см^3$, перемешивают;

раствор № 3. 50 г аммония молибдат растворяют в горячей (свыше 75°С) воде, охлаждают и доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 $см^3$, перемешивают;

раствор № 4 (окрашенная смесь). Равные объемы растворов № 1, 2, 3 последовательно смешивают и в случае появления мути отфильтровывают. Смесь хранят в темном месте при температуре 15—28 °С не более 6 мес;

стандартный раствор фосфата: 4,393 г однозамещенного калия фосфорнокислого, высушенного при температуре 100—105 °С в течение 1 ч, растворяют в стакане или колбочке вместимостью 1000 $см^3$, объем раствора доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и хранят в стеклянной банке с притертой пробкой в течение одного года. В 1 $см^3$ основного раствора содержится 1 мг фосфора;

растворы сравнения. В мерные колбы вместимостью 500 $см^3$ из бюретки на 50 $см^3$ приливают стандартный раствор фосфата в объемах, указанных в таблице 57. В каждую пробу добавляют 5 $см^3$ разбавленного (1:1) раствора кислоты хлористоводородной, доводят объем дистиллированной водой до метки, перемешивают. Хранят не более 3 мес при температуре 15—28 °С в местах, защищенных от прямых солнечных лучей.

При приготовлении растворов сравнения при анализе кормов животного происхождения в мерные колбы вместимостью 500 $см^3$ приливают основной раствор калия фосфата в объемах, указанных в таблице 57. В каждую колбу добавляют 5 $см^3$ концентрированной

57. Основной раствор калия фосфата

№ колбы	Объем стандартного раствора фосфора, $см^3$	Масса фосфора в 100 $см^3$ раствора сравнения, мг
1	0	0
2	3	0,6
3	5	1,0
4	10	2,0
5	20	4,0
6	30	6,0
7	40	8,0
8	50	10,0

азотной кислоты, 25 $см^3$ разбавленной (1:1) кислоты хлористоводородной, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Ход определения. В предварительно прокаленный, охлажденный в эксикаторе и взвешенный с погрешностью не более 0,001 г тигель берут навеску испытуемой пробы, приготовленной по пункту 1, массой 0,5—2,0 г (для кормов животного происхождения берут навеску массой 0,3—0,4 г) в зависимости от ожидаемого содержания фосфора. Тигель помещают в холодную муфельную печь и повышают температуру до 200—250 °С (до появления дыма). Допускается предварительное сжигание пробы на электрической плитке, песочной бане или газовой горелке, при этом следует избегать воспламенения пробы, помещая тигели на асбестовую сетку.

После прекращения выделения дыма температуру в печи увеличивают до 525 ± 25 °С и ведут прокаливание 4—5 ч, затем тигели с золой охлаждают. Отсутствие несгорающих частиц угля и равномерный светло-серый (иногда розовый, зеленоватый или голубоватый) цвет золы указывают на полное озоление навески. В противном случае золу осторожно смачивают несколькими каплями дистиллированной воды, приливают 1—2 $см^3$ пероксида водорода (1 : 9) и содержимое тигля с золой снова помещают в печь, прокаливают при температуре 525 ± 25 °С еще в течение 1 ч. Затем тигели охлаждают, золу смачивают несколькими каплями дистиллированной воды, добавляют 1 $см^3$ кислоты хлористоводородной (1:1) и 5—10 $см^3$ дистиллированной воды, тщательно перемешивают стеклянной палочкой и переносят, не фильтруя, через воронку в мерную колбу вместимостью 100 $см^3$. Тигель и воронку обмывают водой, доводят раствор водой до метки, перемешивают и дают осадку отстояться. Аликвоту для анализа берут, не взмучивая осадка. Подготовка контрольного раствора (холостое определение) включает все стадии анализа, кроме взятия навески.

Золу, полученную при сжигании костной, мясокостной или рыбной муки, смачивают несколькими каплями дистиллированной воды, приливают 1 $см^3$ концентрированной азотной кислоты, затем 5 $см^3$ разбавленного (1:1) раствора кислоты хлористоводородной, доводят до кипения, охлаждают и содержимое тигеля перено-

сят, не фильтруя, через воронку в колбу вместимостью 100 см^3, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают.

Из раствора озолята анализируемых проб пипеткой берут по 10 см^3 раствора и переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3, добавляют 5 см^3 раствора азотной кислоты (раствор № 1) и 15 см^3 окрашивающего раствора № 4, доводят дистиллированной водой до метки. После каждого добавления растворов и воды растворы тщательно перемешивают.

Через 30 мин окрашенные растворы сравнения фотометрируют против нулевого раствора шкалы (раствор № 1), не содержащего фосфор, а испытуемые зольные растворы анализируемых образцов — относительно контрольного (холостого) раствора.

Фотометрирование проводят в кювете с толщиной просвечиваемого слоя 5—20 мм, используя синий светофильтр с максимумом светопропускания в области 440—405 нм. Если оптическая плотность испытуемого раствора превышает оптическую плотность раствора сравнения, анализируемый раствор разбавляют нулевым раствором шкалы до оптимальной для фотометрирования концентрации (оптическая плотность 0,2—0,8) и повторяют описанные выше операции в том же порядке. Полученный результат увеличивают во столько раз, во сколько был разбавлен раствор анализируемой пробы.

По результатам фотометрирования растворов сравнения строят градуировочный график, откладывая на оси абсцисс содержание фосфора в 100 см^3 растворов сравнения в миллиграммах, на оси ординат — соответствующее значение оптической плотности.

Для построения каждой точки градуировочного графика вычисляют среднее арифметическое значение оптической плотности двух отсчетов на приборе.

Массовую долю фосфора (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_1 \cdot 100}{m},$$

где m_1 — масса фосфора в навеске, найденная по графику, мг; 100 — коэффициент пересчета в проценты; m — масса навески, мг.

Массовую долю фосфора в пересчете на абсолютно сухое вещество (x_1) в процентах вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{x \cdot 100}{100 - W},$$

где x — массовая доля фосфора в испытуемой пробе, %; W — массовая доля влаги в испытуемой пробе, %, определяется по ГОСТ 27548; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

7.2.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЫРОГО ЖИРА (ГОСТ 13496.15—97)

Принцип. Метод основан на экстракции сырого жира из взвешенной анализируемой пробы растворителем и взвешивании обезжиренного остатка. Предназначен для испытания растительных кормов всех видов, комбикормов, комбикормового сырья, кормов животного сырья, кормов животного происхождения (метод не распространяется на кормовые дрожжи).

Для испытания кормов всех типов в качестве растворителя используют диэтиловый эфир, для испытания костной и рыбной муки, муки из морских млекопитающих и ракообразных наряду с диэтиловым эфиром допускается использовать петролейный эфир. Для испытания хлопковых жмыхов и шротов используют петролейный эфир.

Реактивы: эфир медицинский (диэтиловый);
эфир петролейный (фракция 40—70 %).

Оборудование: аппарат Сокслета вместимостью 150, 250, или 500 $см^3$; измельчитель проб растений ИПР-2; мельница лабораторная МПР-2; сушильный шкаф с терморегулятором; эксикатор; сито с отверстиями диаметром 1 мм; ножницы; бюксы стеклянные; аналитические весы; водяная баня, бумага фильтровальная марки ФНБ.

Готовят пробы к испытанию по ГОСТ Р 51419—99, доводя их до воздушно-сухого состояния. Комбикорма, жмыхи, шроты, брикеты, гранулы размалывают без предварительного высушивания.

Ход определения. Из фильтровальной бумаги размером 100 × 90 мм делают пакетик, обезжиривают в эфире в аппарате Сокслета в течение 1 ч, затем помещают в стеклянную бюксу и сушат в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 1 ч, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. В высушенный и взвешенный пакетик помещают 1—2 г испытуемой пробы с погрешностью не более 0,001 г. Пакетик закрывают, помещают в ту же бюксу и высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 3 ч. Затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Приготовленные таким образом 8—12 пакетиков с испытуемой пробой помещают в экстрактор аппарата Сокслета вместимостью 250 $см^3$ вертикально по 4 пакетика в ряд. В экстрактор наливают эфир так, чтобы он покрывал пакетики. Эфир наливают и в колбу аппарата Сокслета в таком количестве, чтобы после слива его из экстрактора общий объем растворителя не превышал 2/3 объема колбы. Затем собирают аппарат и оставляют его в таком виде на ночь. Экстракцию проводят на следующий день, предварительно пустив воду в холодильник для охлаждения паров эфира.

Нагревают аппарат Сокслета на водяной бане. При нормальном кипении эфира должно быть 6—7 сливов в 1 ч. Экстракцию проводят 5—8 ч. В образцах с высоким содержанием жира (костная, мясокостная, рыбная мука и из морских млекопитающих и рако-

образных) для более полного его извлечения время экстракции увеличивают до 10—12 ч. По окончании экстракции пакетики вынимают из аппарата и раскладывают их так, чтобы дать испариться эфиру (в вытяжном шкафу), и сушат в тех же бюксах при температуре 105 °С в течение 1 ч. Затем их охлаждают в экстракторе и взвешивают. Последующее взвешивание проводят после повторной сушки в течение 30 мин. Сушку и взвешивание повторяют до тех пор, пока разность результатов двух последних взвешиваний составит не более 0,001 г.

Массовую долю сырого жира в сухом веществе (x) в процентах вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100,$$

где m_2 — масса бюксы с пакетиком и навеской до обезжиривания, г; m_3 — масса бюксы с пакетиком и навеской после обезжиривания, г; m_1 — масса высушенной бюксы с пакетиком, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

За результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результаты вычисляют до третьего знака и округляют до второго десятичного знака.

Источник: 24.

7.2.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАРОТИНА (ГОСТ 13496.17—95)

Принцип. Метод состоит в растворении каротина в петролейном эфире или бензине и фотометрическом измерении окраски, интенсивность которой зависит от содержания каротина.

Реактивы: кальция оксид безводный (ч., ч. д. а);

алюминия оксид безводный;

натрия сульфат безводный (ч., ч. д. а);

натрия гидрокарбонат (х. ч., ч. д. а);

калия бихромат (х. ч., ч. д. а.);

эфир петролейный, фракция с температурой кипения 40—70 или 70—100 °С, бензин авиационный марки Б-70 или нефрас-С 50/170;

вода дистиллированная.

Оборудование: измельчитель проб растений ИПР-2; мельница лабораторная марки МРП-2; фотоэлектроколориметр с синим светофильтром и максимумом светопропускания 440—450 нм или спектрофотометр; весы лабораторные 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 г; весы лабораторные 3-го и 4-го классов точности с пределом взвешивания 500 г; термостат, обеспечивающий поддержание температуры (35 ± 3)°С; ступка фарфоровая с пестиком; колбы мерные; бюретки; цилиндр мерный; карандаш восковой для стекла; банки бытовые вместимостью 200 $см^3$ или

колбы вместимостью 150—200 $см^3$; крышки полиэтиленовые для банок или пробки для колб.

Допускается применение импортной лабораторной посуды по классу точности и реактивов по качеству не ниже перечисленных.

Все работы с петролейным эфиром и бензином проводят в вытяжном шкафу.

Подготовка реактивов к испытанию:

приготовление окиси алюминия 10%-ной влажности. К 900 г безводного алюминия оксида добавляют 100 $см^3$ дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Реактив хранят в герметически закрытом сосуде с притертой пробкой и используют для анализа на следующий день;

приготовление кальция оксида безводного. Готовят путем растирания кальция оксида в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. Реактивы хранят в герметически закрытой банке;

калибровка бытовых банок. Во все банки вносят 5 г чистого кварцевого песка или измельченного стекла (при использовании гомогенизатора их добавлять не нужно), 15 г натрия сульфата, 10 г алюминия оксида, 0,5 г окиси кальция и 100 $см^3$ бензина и наносят метку;

приготовление основного (стандартного) раствора калия бихромата. 0,720 г калия бихромата, взвешенного с погрешностью не более 0,001 г, растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1000 $см^3$ и затем объем раствора доводят до метки и тщательно перемешивают. Оптическая плотность полученного раствора равна оптической плотности раствора каротина концентрацией 0,00416 мг/ $см^3$. Раствор хранят в течение одного года после его приготовления;

приготовление растворов сравнения. В мерную колбу вместимостью 100 $см^3$ из бюретки приливают каждый раз от нуля 10, 20, 30, 40, 50 $см^3$ основного раствора калия бихромата и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают. Срок хранения раствора сравнения не более 3 мес.

Фотометрирование растворов сравнения проводят в кювете с толщиной просвечиваемого слоя 5, 10 или 20 мл при длине волны 450 нм. Оптическую плотность растворов калия бихромата измеряют относительно дистиллированной воды.

Для подсчета градуировочного графика на миллиметровой бумаге по горизонтальной оси наносят значения объемов основного раствора калия бихромата, взятых для приготовления растворов хранения, на вертикальной оси — соответствующую оптическую плотность растворов. Градуировочный график строят для каждой кюветы. Проверку градуировочного графика выполняют в день проведения испытаний по второму и пятому растворами сравнения. При нестабильной работе прибора фотометрируют все растворы сравнения и строят график.

Подготовка проб к анализу:

пробу зеленой массы травянистых культур, силоса, сенажа измельчают на ИПР-2 или ножницами до отрезков длиной 1—3 см. Измельченную пробу корма тщательно перемешивают на полиэтиленовой пленке и методом квартования выделяют часть пробы массой 100—200 г, которую размалывают на мельнице в течение 2—4 мин. Кормовые корнеплоды измельчают на мезгообразователе или растирают на терке;

пробу сена (измельченную на ИПР-2 или ножницами до отрезков длиной 1—3 см), травяной муки или витаминной муки из древесной зелени, гранул или брикетов тщательно перемешивают на полиэтиленовой пленке и методом квартования выделяют часть пробы массой 100—200 г, которую размалывают на мельнице. Травяную муку размером частиц 1—2 мм анализируют без предварительного размола.

Ход определения. Из подготовленной измельченной пробы травянистых культур, силоса, сенажа после тщательного ее перемешивания из разных мест берут навеску корма массой 1—5 г с погрешностью не более 0,05 г. Массу навески определяют в зависимости от ожидаемого содержания каротина. Навеску зеленой массы, силоса, сенажа переносят в фарфоровую ступку, добавляют 5 г песка или мелко измельченного стекла, 15 г натрия сульфата (при навеске 4—5 г добавляют до 20—25 г). В навеску силоса и сенажа, кроме того, добавляют на кончике ножа натрий гидрокарбонат. Смесь тщательно растирают не менее 3—4 мин.

Хорошо растертый и обезвоженный корм без потерь переносят в бытовую банку или колбу вместимостью 200 см, приливают 100 $см^3$ петролейного эфира или бензина; обмывают ступку и пестик его минимальным количеством. Добавляют в банку 10 г алюминия оксида 10%-ной влажности и 0,5 г растертого до порошкообразного состояния кальция оксида, перемешивают стеклянной палочкой, плотно закрывают банку полиэтиленовой крышкой, а колбу пробкой.

Из измельченной и хорошо перемешанной пробы сена, травяной муки, брикетов или гранул из разных мест берут навеску массой около 1—3 г, для сена до 5 г и переносят в бытовую банку или колбу вместимостью 200 $см^3$. Добавляют 5 г безводного натрия сульфата, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, вносят 10 г алюминия оксида 10%-ной влажности, 0,5 г кальция оксида и 100 $см^3$ петролейного эфира или бензина и снова перемешивают.

Измельчение анализируемой пробы можно проводить и на гомогенизаторе. В этом случае после измельчения пробы сена, силоса, сенажа или зеленой массы травянистых культур на ИПР-2 или ножницами ее тщательно перемешивают и из разных мест берут навеску массой 1—5 г, переносят в стакан гомогенизатора, на дно которого насыпано 15 г натрия сульфата (в навеску силоса и сенажа добавляют натрия гидрокарбонат), приливают 50—60 $см^3$ экстрагента

и гомогенизируют 2 мин при частоте вращения 5000 мин$^{-1}$. Затем навеску переносят в бытовую банку (колбу), тщательно обмывая стакан гомогенизатора минимальным количеством экстрагента. Добавляют в банку 10 г алюминия оксида 10%-ной влажности и 0,5 г кальция оксида, доводят экстрагентом до метки и перемешивают.

Плотно закрытые банки или колбы оставляют в темном месте на 14—18 ч. При проведении экспресс-испытания единичных образцов допускается заменять настаивание термостатированием. Для этого плотно закрытые банки или колбы помещают на 2 ч в предварительно нагретый до 35 °С термостат. Затем пробы охлаждают до комнатной температуры. В целях безопасности работы следует следить за строгим соблюдением температуры во время термостатирования. Перед работой необходимо убедиться в исправности термостата и правильности показаний термометра.

После настаивания или термостатирования, не взмучивая, отбирают шприцем прозрачный отстоявшийся раствор и переносят в кювету фотоэлектроколориметра. Фотометрирование экстрактов каротина проводят относительно петролейного эфира или бензина, используя кювету на 5, 10 или 20 мм.

При оптической плотности раствора более 0,7 в мерную колбу вместимостью 50 см^3 вносят 25 см^3 анализируемой вытяжки, доводят до метки петролейным эфиром (или бензином) и перемешивают. При этом полученные результаты определения каротина удваивают.

Содержание каротина (x, мг/кг) в корме натуральной влажности вычисляют по формуле

$$x = \frac{V \cdot 0{,}00416 \cdot 1000}{m},$$

где V — объем основного раствора, найденный по графику, см^3; 0,00416 — коэффициент пересчета основного раствора калия бихромата в эквивалентное количество миллиграммов каротина; 1000 — коэффициент пересчета на 1 кг корма; m — масса навески, г.

За окончательный результат испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результаты вычисляют до первого десятичного знака и округляют до целого числа.

Содержание каротина в сухом веществе (x_1, мг/кг) вычисляют по формуле

$$x_1 = \frac{x \cdot 100}{100 - W},$$

где x — содержание каротина в 1 кг корма натуральной влажности, мг; W — влажность корма, %.

7.2.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ КИСЛОТНОСТИ (ГОСТ 13496.12—98)

Принцип. Метод состоит в pH-метрическом титровании водной вытяжки пробы комбикорма или комбикормового сырья раствором калия гидроксида до pH 8,20 и последующим расчетом общей кислотности, исходя из объема израсходованной на титрование щелочи, и определения градуса Неймана.

Реактивы: калия гидроксид (х. ч.) по ГОСТ 24363 или стандарт-титр (использование натрия гидроксида недопустимо);

вода дистиллированная;

бумага фильтровальная.

Оборудование: иономер ЭВ-74; электрод стеклянный лабораторный ЭСЛ-63-07 для измерения при температуре от 25 до 100 °С; электрод сравнения хлорсеребряный насыщенный образцовый 2-го разряда; термокомпенсатор ТКА-7; термометр 1-63 ТЛ-2; мешалка магнитная ММ-3; мельница лабораторная МРП или другие аналогичных марок; сито с отверстиями диаметром 1 мм; ступка фарфоровая с пестиком; ножницы; весы лабораторные 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г; набор гирь; колбы мерные вместимостью 25 и 1000 $см^3$ исполнений 1-го, 2-го класса точности; колба мерная вместимостью 500 $см^3$; стакан химический вместимостью 50 $см^3$ или 100 $см^3$; цилиндр мерный вместимостью 250 $см^3$ 2-го класса точности; пипетки градуированные вместимостью 1 и 10 $см^3$ 2-го класса точности; воронки стеклянные диаметром 36—56 мм; палочка стеклянная длиной 15—20 см.

Подготовка к анализу. Из средней пробы отбирают около 100 г комбикорма или комбикормового сырья, тщательно измельчают на мельнице и просеивают через сито с отверстиями диаметром 1 мм.

Электроды стеклянный лабораторный и сравнения хлорсеребряного насыщения готовят к работе в соответствии с паспортами на них. После каждого измерения электроды промывают дистиллированной водой и осушают фильтровальной бумагой. Хранят их в дистиллированной воде.

Ионометр ЭВ-74 к работе в режиме pH-метра готовят в соответствии с паспортом.

Для приготовления раствора калия гидроксида концентрации $c(KOH) = 0{,}1$ моль/$дм^3$ навеску реактива массой 5,611 г переносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, растворяют в дистиллированной воде, старательно перемешивают и доводят до метки. Допускается приготовление раствора из фиксанала.

Для определения коэффициента поправки раствора калия гидроксида около 80 $см^3$ этого раствора переносят в стакан вместимостью 100 $см^3$, куда опускают электродную пару, и при постоянном перемешивании на магнитной мешалке измеряют pH.

Коэффициент поправки раствора калия гидроксида (K) рассчитывают по формуле

$$K = \frac{10^{-(14-pH)}}{0,1},$$

где $10^{-(14-pH)}$ — точная концентрация раствора калия гидроксида, моль/дм^3; pH — показание иономера; 0,1 — заданная концентрация раствора калия гидроксида, моль/дм^3.

Ход определения. Навеску исследуемого продукта массой 26 г помещают в сухую коническую колбу вместимостью 500 см^3, приливают 250 см^3 дистиллированной воды и, закрыв колбу пробкой, взбалтывают непрерывно в течение 10 мин. 25 см^3 полученной таким образом суспензии через воронку отливают по стеклянной палочке в мерную колбу на 25 см^3. Содержимое колбы количественно переносят в стакан вместимостью 50 или 100 см^3, куда опускают электродную пару. При постоянном перемешивании на магнитной мешалке к суспензии пипеткой по каплям добавляют раствор калия гидроксида концентрации с(КОН) = 0,1 моль/дм^3 до тех пор, пока pH не достигнет значения 8,2. Используют пипетку вместимостью 10 см^3, если pH суспензии меньше 6,0, или 1 см^3, если pH суспензии больше 6,0.

Объем израсходованной на титрование щелочи фиксируют в лабораторном журнале.

Общую кислотность комбикорма или комбикормового сырья (x), выраженную в градусах Неймана (°Н), рассчитывают по формуле

$$x = 4 \cdot VK,$$

где 4 — коэффициент пересчета на 100 г продукта; V — объем раствора калия гидроксида, израсходованный для достижения pH 8,2, см^3; K — коэффициент поправки раствора калия гидроксида, рассчитанный ранее (см. предыдущую формулу).

За конечный результат анализа принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений. Результаты округляют до второго десятичного знака.

7.2.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИСЛОТНОГО ЧИСЛА ЖИРА (ГОСТ 13496.18—85)

Принцип. Метод заключается в потенциометрическом титровании свободных жирных кислот, извлеченных из продукта экстрагированием смесью хлороформа и этилового спирта.

Реактивы: калия гидроксид. Раствор концентрации с(КОН) = = 0,1 моль/дм^3 (0,1 н.) или фиксанал;

кислота серная. Раствор концентрации с(1/2 H_2SO_4) = 0,1 моль/дм^3 (0,1 н.) или фиксанал;

хлороформ технический;

спирт этиловый технический или спирт этиловый для бутадиена, или спирт этиловый ректификованный технический;

фенолфталеин, раствор с массовой долей 1%;

вода дистиллированная.

Оборудование: мельница лабораторная марки ЛЗМ; сито металлическое с отверстиями диаметром 1 мм; весы лабораторные не ниже 2-го класса точности с пределом взвешивания 200 и 500 г или другие весы того же класса точности; аппарат для встряхивания жидкости в сосудах АВУ-1; вакуум-насос Комовского; мешалка магнитная ММ-3М; pH-метр pH-673 или иономер универсальный ЭВ-74; электрод стеклянный ЭСЛ-43-07; электрод вспомогательный хлорсеребряный ЭВЛ-1М3; баня песчаная или лампа инфракрасная мощностью 50 Вт; эксикатор; бюксы металлические диаметром 50 мм, высотой 38 мм; бюретки исполнений 1, 2, 3 вместимостью 10 и 25 $см^3$ 2-го класса точности; колба с тубусом вместимостью 250 $см^3$; колбы конические вместимостью 250 $см^3$; стаканы стеклянные вместимостью 50 $см^3$; колбы мерные исполнений 1, 2, 3, 4 вместимостью 100 и 1000 $см^3$ 2-го класса точности; пипетки исполнений 2, 3 вместимостью 50 $см^3$ 2-го класса точности; воронка Бюхнера 4 или 5; ступка фарфоровая с пестиком; бумага фильтровальная.

Подготовка к испытанию. Из объединенной пробы комбикорма или сырья выделяют среднюю пробу, масса которой должна быть не менее 500 г. Измельчают ее на мельнице и просеивают через сито. Хранят в стеклянной или пластмассовой банке в сухом месте.

Для приготовления раствора калия гидроксида концентрации $c(KOH) = 0{,}1$ моль/$дм^3$ (0,1 н.) навеску калия гидроксида массой 5,611 г переносят в мерную колбу вместимостью 1000 $см^3$, растворяют в этиловом спирте и доводят объем спиртом до метки.

Коэффициент поправки спиртового раствора КОН устанавливают по раствору серной кислоты концентрации $c(1/2\ H_2SO_4) = 0{,}1$ моль/$дм^3$. Для этого в колбу приливают 20 $см^3$ серной кислоты, добавляют 2 капли фенолфталеина и титруют приготовленным раствором калия гидроксида до бледно-розовой окраски. Объем раствора калия гидроксида, израсходованный на титрование раствора серной кислоты, вычисляют как среднее арифметическое результатов трех определений.

Коэффициент поправки раствора калия гидроксида (K) вычисляют по формуле

$$K = \frac{V_1 K_1}{V},$$

где V_1 — объем раствора серной кислоты, взятой для титрования, $см^3$; K_1 — коэффициент поправки раствора серной кислоты; V — объем раствора калия гидроксида, израсходованный на титрование 20 $см^3$ раствора серной кислоты, $см^3$.

Приготовление экстрагирующей смеси. Смешивают 1 часть этилового спирта и 2 части хлороформа. В смесь добавляют 5 капель раствора фенолфталеина и для устранения примесей, возможных в экстрагирующей смеси, нейтрализуют раствором калия гидроксида до слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с.

Ход определения. При испытании комбикормов или шротов берут навеску массой 25 г, при испытании мясокостной муки —

массой 10 г, при испытании белково-жирового концентрата или рыбной муки — массой 2 г. Навеску переносят в колбу вместимостью 250 см^3, приливают 80 см^3 спирто-хлороформенной смеси. Полученную суспензию встряхивают в течение 5 мин на аппарате для встряхивания, затем фильтруют с помощью вакуумного насоса, используя при этом воронку Бюхнера с бумажным фильтром и колбу с тубусом.

Профильтрованный экстракт переносят в колбу на 100 см^3. В нее добавляют остатки экстракта, смывая их два раза по 10 см^3 спирто-хлороформенной смеси со стенок колбы с тубусом. Содержимое колбы тщательно перемешивают. Для титрования в стакан вместимостью 50 см^3 пипеткой вносят 30 см^3 экстракта и опускают туда же смесительный стержень. Стакан устанавливают на магнитную мешалку, включают ее и затем опускают в стакан электроды pH-метра.

Титруют экстракт раствором калия гидроксида до эквивалентной точки в интервале pH от 10,0 до 12,0.

После каждого определения электроды обмывают спирто-хлороформенной смесью.

Для определения массы жира одновременно с отбором экстракта для титрования отбирают еще 15 см^3 экстракта и помещают его в предварительно высушенную до постоянной массы металлическую бюксу. Бюксу с экстрактом помещают на песчаную баню, нагретую до 200 °С, и выпаривают до полного исчезновения запаха хлороформа (8—10 мин). Наружную поверхность бюксы тщательно очищают от песка, бюксу охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Для сушки жира используют также инфракрасную лампу. Для этого бюксу с экстрактом помещают на асбестовый лист под центр лампы на расстоянии 90 мм от нее и сушат в течение 15 мин. Затем бюксы закрывают крышкой, выдерживают в эксикаторе в течение 10—15 мин и взвешивают.

Массу жира, содержащуюся в 30 см^3 экстракта, взятого для титрования, вычисляют по разности бюксы с высушенным жиром и пустой бюксы и умножают на 2.

Кислотное число жира (x) в миллиграммах калия гидроксида на 1 г жира вычисляют по формуле

$$x = \frac{5{,}611 \cdot KV}{m},$$

где 5,611 — массовая концентрации калия гидроксида в растворе молярной концентрации 0,1 моль/дм^3, мг/см^3; K — коэффициент поправки раствора калия гидроксида; V — объем раствора калия гидроксида, пошедший на титрование, см^3; m — масса жира, г.

За результаты испытания принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных определений.

Вычисление производят с точностью до второго знака и округляют до первого.

Погрешность методики выполнения измерений составляет ±0,4 мг.

7.2.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ В ЖМЫХАХ И ШРОТАХ (ГОСТ 13979.9—69)*

Принцип. Метод основан на изменении pH фосфатного буферного раствора, которое образуется в результате воздействия уреазы на содержащуюся в растворе мочевину.

Реактивы: мочевина;

известь натронная;

раствор фосфатный буферный образцовый с pH около 7,0;

калия фосфат однозамещенный (KH_2PO_4) или натрия фосфат однозамещенный 2-водный ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$);

калия фосфат двузамещенный 3-водный ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) или натрия фосфат двузамещенный безводный (Na_2HPO_4), или натрия фосфат двузамещенный 12-водный ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$);

вода дистиллированная, не содержащая углекислого газа (прокипяченная).

Оборудование: весы аналитические; pH-метр и аналогичный прибор, с пределами измерений от минус 1 до 14 единиц pH с ценой деления индикатора от 0,01 до 0,1; электрокофемолка бытовая или аналогичное измельчающее устройство; баня водяная с терморегулятором или другое термостатирующее устройство, позволяющее поддерживать температуру 30±2 °С; электроплитка бытовая; термометр жидкостный стеклянный, позволяющий измерять температуру в диапазоне 0—50 °С, с ценой деления 1—2 °С; колба мерная; стаканы В-1-100 или В-1-150ТС; колбы конические или колбы плоскодонные; цилиндр; сито с отверстиями диаметром 0,5 мм из набора лабораторных сит.

Подготовка к измерениям. Дистиллированную воду кипятят на электроплитке в течение 15 мин для удаления углекислого газа и охлаждают в колбе, закрытой пробкой и снабженной трубкой с натронной известью.

При отсутствии стандарт-титров (фиксаналов) буферный раствор готовят следующим образом. Предварительно калий одно- и двузамещенный подвергают перекристаллизации. С этой целью отдельно в химические стаканы помещают соли, добавляют немного дистиллированной воды (делают перенасыщенный раствор), нагревают на электрической плитке до полного растворения солей, охлаждают в холодильнике (кристаллы выпадают в осадок через 15 мин), сливают воду и кристаллы высушивают в сушильном шкафу при температуре 110°С, охлаждают в эксикаторе.

Фосфатный буферный раствор с концентрацией 0,05 моль/л готовят из смеси двух растворов одно- и двузамещенного калия фосфата аналогичной концентрации. Для приготовления первого берут 3,40 г и второго — 4,35 г соответствующей соли, полученной после перекристаллизации, переносят в мерные колбы на 500 $см^3$,

---

* С изменениями, утвержденными в 1983, 1987 и 1995 годах (ИУС 7—83, 10—87, 6—95).

растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, тщательно перемешивают и содержимое доводят дистиллированной водой до метки. Фосфатный буфер с pH 7,0 получают путем смешивания 233,4 $см^3$ первого и 366,6 $см^3$ второго растворов в мерной колбе на 1000 $см^3$ с добавлением до метки дистиллированной водой. Водородный показатель (pH) полученного буферного раствора проверяют на pH-метре (раствор А). Полученный раствор А хранят в темном месте не более 1 мес.

Для приготовления буферного раствора Б с мочевиной растворяют мочевину в растворе А в колбе вместимостью 500 или 1000 $см^3$ из расчета 1,5 г мочевины на 50 $см^3$ раствора А. Раствор Б хранят в темном месте не более 10 дней.

Для подготовки образца из средней пробы методом диагонального деления отбирают пробу для анализа массой около 10 г. Измельчают ее до прохода не менее 60 % через сито с отверстиями диаметром 0,5 мм. Остаток на сите вновь измельчают и просеивают через сито. Просеянный материал вновь смешивают с остатками на сите и используют для взятия пробы. При масличности продукта более 2 % после измельчения его обезжиривают.

Ход определения. На аналитических весах взвешивают 3 пробы тщательно измельченного материала массой 1 ± 0,01 г и помещают в стеклянные стаканы вместимостью 100 или 150 $см^3$. В один стакан приливают 50 $см^3$ раствора А и помещают в водяную баню с температурой 30 ± 2° С. Во второй и третий стаканы с интервалом в 5 мин приливают по 50 $см^3$ раствора Б, помещают их немедленно после приливания раствора в ту же водяную баню. Время термостатирования 30 мин, при этом следует каждые 5 мин перемешивать содержимое стакана стеклянной палочкой, заканчивают перемешивание за 5 мин до конца нагрева. По истечении 30 мин выдержки жидкость над осадком из каждого стакана декантируют в стаканчики прибора и определяют pH каждого раствора в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией.

Активность уреазы (A) в единицах pH вычисляют по формуле

$$A = pH_1 - pH_0,$$

где pH_1 — значение pH в основном измерении (с раствором Б); pH_0 — значение pH в контрольном измерении (с раствором А).

За окончательный результат измерения принимают среднее арифметическое результатов двух параллельных измерений, расхождение между которыми не должно превышать 30 % от среднего арифметического значения pH при доверительной вероятности 0,05. Все вычисления проводят с записью результатов до второго десятичного знака.

Источник: 59.

ГЛАВА 8

МЕТОДЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

8.1. ОБЪЕКТЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Основная задача токсикологического исследования — постановка лабораторного диагноза на отравление сельскохозяйственных и диких промысловых животных, рыбы и пчел путем обнаружения яда в патологическом материале, кормах или воде с помощью химико-аналитических или биологических методов. Поэтому главной составной частью лабораторного токсикологического анализа является токсикологическая химия — наука о химических методах изолирования, идентификации и количественном определении ядовитых и сильнодействующих веществ, а также продуктов их превращения в тканях, органах и жидкостях животных и объектах окружающей среды.

При подозрении на отравление животных в лабораторию направляют патологический материал (печень, почки, мышцы вместе с жировой тканью, содержимое желудка и кишечника, рвотные массы) в количестве 100—200 г, образцы кормов и воды, которые получали животные до развития клинических признаков заболевания или в период их возникновения, а также образцы лекарственных веществ, дезинфектантов, пестицидов, которыми обрабатывали животных, животноводческие помещения, пастбища, рыбоводные водоемы или растительность вокруг пасек.

Павшую птицу, рыбу, мелких млекопитающих (поросят, кроликов) направляют в лабораторию целыми тушами вместе с образцами воды водоемов, где был отмечен падеж рыбы, а также с образцами растительности в зоне гибели диких промысловых животных, в том числе птиц. Трупы пчел отбирают в количестве не менее 50—100 экз. и отправляют в лабораторию одновременно с образцами меда (100—200 г), взятого из улья или пасеки, где произошла массовая гибель.

Каждую пробу отобранного образца помещают в отдельную чистую стеклянную банку или термос, закрывают притертой стеклянной, а при ее отсутствии полиэтиленовой крышкой, опечатывают сургучной печатью или пломбируют, наклеивают на стенку этикетку с указанием количества и наименования материала. Образцы корма (силос, грубые корма, корнеклубнеплоды, комбикорма) помещают в полиэтиленовые или матерчатые мешочки, в ко-

торые вкладывают этикетки, написанные простым карандашом с обозначением сведений, указанных выше. Павших пчел помещают в сухие картонные коробки с наклеенной или помещенной внутрь этикеткой.

В сопроводительном документе указывают наименование хозяйства, вид, пол и возраст животного, анамнестические и клинические данные, результаты патологоанатомического вскрытия, состав и рецептуру комбикорма или же рацион кормления с описанием качества кормов, предполагаемый прижизненный или посмертный диагноз, сведения о наличии в хозяйстве инфекционных болезней.

Патологический материал направляют в лабораторию нарочным сразу же после его взятия без фиксации. При невозможности этого материал фиксируют путем глубокой заморозки или консервируют этиловым спиртом-ректификатом, 4%-ным водным раствором формальдегида. Вместе с пробами в лабораторию направляют образцы спирта или формальдегида, использованные для консервирования патматериала. Образцы кормов, воды, растений, пчел, меда направляют в лабораторию без фиксации.

В лаборатории образцы делят на части, в зависимости от характера предполагаемого исследования. Одну из частей опечатывают, помещают в морозильную камеру холодильника или в специальный холодильник глубокой заморозки, корма складывают в отдельное помещение и хранят в течение 1 года в качестве контрольного образца на случай, если возникнет необходимость в проведении повторных химико-токсикологических исследований.

Если животных обрабатывали какими-либо химическими веществами или лекарственными препаратами, в этом случае патологический материал исследуют на те химические соединения или фармакологические средства, которые использовались для обработок. При наличии данных о том, что гибель животных связана с использованием в рационе кормов новых видов или кормовых добавок, изучают их состав и корма исследуют на общую токсичность биологической пробой на белых мышах или простейших.

Доставленный в лабораторию материал начинают исследовать визуально с осмотра, обнаружения в нем посторонних включений. Так, в содержимом желудочно-кишечного тракта могут быть остатки ядовитых растений (веха ядовитого, аконита и др.), по которым можно дать предварительное заключение.

Трупы животных подвергают патологоанатомическому исследованию с оформлением протокола вскрытия, обращая особое внимание на состояние печени и слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта.

Корма подвергают органолептическому анализу на присутствие в нем плесеней, посторонних не свойственных корму данного вида злаков. В силосе определяют pH. Корма, имеющие гнилостный запах с наличием пораженных плесенью участков, должны быть исследованы на содержание микотоксинов. При органолептическом

анализе грубых кормов и зерна обращает внимание на наличие головни и спорыньи.

При подозрении на отравления, связанные с недоброкачественными кормами (поражение плесенью, несвойственный запах, цвет), корма подвергают токсикологическому анализу в соответствии с Методическими указаниями по санитарно-токсикологической оценке и улучшению качества кормов, утвержденными ГУВ МСХ СССР от 25.02.1985 г.

8.2. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ

Отравления сельскохозяйственных животных и птиц фосфорорганическими пестицидами (ФОП) чаще всего бывают при их применении для обработки животных с целью защиты от насекомых и клещей в результате завышения доз и концентраций препаратов, а также образования токсичных продуктов в процессе их хранения (нарушение герметизации емкостей, проникновение в них влаги и другие причины). Значительно реже регистрируют отравления животных при использовании ФОП для защиты растений, так как животные не поедают обработанные растения из-за неприятного запаха большинства пестицидов этой группы. Однако при обработке растений вблизи пасек отмечены случаи гибели пчел, которые очень чувствительны к фосфорорганическим инсекто-акарицидам. ФОП в окружающей среде довольно быстро разрушаются и сравнительно не токсичны для рыбы, поэтому отравления рыбы и других гидробионтов пестицидами этой группы сравнительно редки. Отмечены лишь случаи гибели рыбы в результате сброса в рыбоводные водоемы плохо очищенных сточных вод заводов, производящих ФОП.

В настоящее время зарегистрированы и разрешены к применению в качестве средств защиты растений и животных следующие ФОП: актеллик, пиримифосметил; антио; препараты на основе диазинона (базудин, неоцидол, диозол) и фосфамида (БИ-58, диметоат); байтекс; хлорофос (негувон, трихлорфон); циодрин; фозалон; карбофос (малатион).

Для определения ФОП в патологическом материале, кормах, препаративных формах с целью постановки диагноза на отравление наибольшее распространение получили методы на основе тонкослойной (ТСХ) и газожидкостной хроматографии (ГЖХ).

Определение ФОП методом ТСХ. Для определения ФОП методом ТСХ в качестве проявляющих реагентов используют смеси различных химических соединений, таких, как ацетоновые растворы бромфенолового синего и азотнокислого серебра с последующей обработкой пластинки лимонной кислотой; 0,7%-ный раствор 2,6-дибром-N-хлорхинонимина в гексане и некоторые другие. Однако наибольшее применение получили методы с использованием в

качестве проявляющего реагента энзимного реактива (М. В. Письменная, 1979; В. В. Карнаухов, 1985).

Принцип. Определение ФОП методом ТСХ с энзимным проявлением основано на их извлечении из пробы органическим растворителем, очистке осаждением на холоде, концентрировании экстракта, развитии соединения на пластинках с сорбентом и проявлении его с помощью реактива, содержащего фермент холинэстеразу.

В основе использования энзимного проявителя лежит способность ФОП (производных фосфорной и фосфоновой кислот) подавлять в условиях in vitro активность фермента (энзима) холинэстеразы. Степень ингибирования активности фермента определяют по уровню расщепления субстрата, в качестве которого используют индоксилацетат или броминдоксилацетат. Если в исследуемой пробе присутствует ФОП, он подавляет активность холинэстеразы, которая, в свою очередь, не расщепляет или слабо расщепляет субстрат. В результате этого на всей поверхности пластинки, где нет ФОП и активность фермента высокая, происходит расщепление субстрата и пластинка окрашивается в голубой цвет. В местах содержания ФОП на голубом фоне они выделяются в виде белых пятен.

Однако производные тио- и дитиокислот фосфора (фосфамид, байтекс, карбофос и некоторые другие) обладают слабой способностью подавлять активность холинэстеразы. Для того чтобы они обладали такой способностью, их активируют с помощью раствора брома, аммиака или путем облучения УФ-лучами. При определении в патологическом материале фосфамида или антио активацию проводят с помощью УФ-лучей, валексона, байтекса, карбофоса, метафоса — водным раствором брома; хлорофоса — водным раствором аммиака.

Реактивы: ацетон (х. ч.);
метилена хлорид (х. ч);
натрия сульфат безводный (ч. д. а.);
натрия тиосульфат, 25%-ный водный раствор;
гексан (х. ч.);
спирт этиловый ректификат;
бром; индоксилацетат (ч. д. а.);
броминдоксилацетат (ч. д. а.);
калий железисто-синеродистый, 1,5%-ный водный раствор;
калий железисто-синеродистый, 20%-ный водный раствор;
буферный раствор, pH 8,69: 2,1 мл ортофосфорной, 2,3 мл уксусной и 2,47 г борной кислот помещают в колбу на 1 л и доводят до метки дистиллированной водой. К 100 мл указанной смеси добавляют 65 мл 0,2 н. раствора NaOH, который готовят растворением 0,8 г NaOH в 100 мл дистиллированной воды.

Ферментный препарат получают из печени крупного рогатого скота, уток или кур (свежезамороженную печень можно хранить в морозильной камере холодильника 4 мес). Для приготовления фер-

ментного раствора 1 г печени растирают в ступке с 9 мл буферного раствора, фильтруют через вату. К 1 мл полученного гомогената добавляют 4 мл буферного раствора. Приготовленный препарат используют для опрыскивания пластинок. Применяют свежеприготовленный раствор.

Основной стандартный раствор ФОП готовят путем растворения 10 мг пестицида в 100 мл ацетона (100 мкг/мл). Из этого раствора готовят на ацетоне рабочие стандартные растворы от 0,01 до 0,5 мкг/мл.

Проявляющий реактив: 10 мг индоксилацетата или 5 мг броминдоксилацетата растворяют в 6 мл этанола, добавляют 10 мл дистиллированной воды, 2 мл 1,5%-ного водного раствора железисто-синеродистого калия, 2 мл 2%-ного водного раствора железисто-синеродистого калия и хорошо перемешивают. Раствор готовят перед опрыскиванием.

Оборудование: камера для хроматографирования; камера для опрыскивания пластинок; пластинки для хроматографии «Силуфол» производства Чехии; отечественные пластинки «Армсорб» на фольге или стекле; «Плазмохром» на полимере; круглодонные и грушевидные колбы на шлифах на 25, 50 и 100 мл; пипетки на 1,5 и 10 мл; эксикаторы; воронки делительные на 250 и 500 мл; мерные колбы на 25 и 50 мл; баня водяная; вакуум-ротационный испаритель ИР-1; термостат; ступки керамические; компрессор или баллон с азотом или сжатым воздухом для распыления проявляющего реактива; пульверизаторы стеклянные; микрошприц на 100 мкл; микропипетки до 0,1 мл; шуттель-аппарат.

Ход определения. 10 г измельченной ткани (печень, почки, мышцы) помещают в колбу с притертой пробкой и заливают 30 мл ацетона. Колбу встряхивают на шуттель-аппарате в течение 1 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в другую колбу. Остаток в колбе промывают 10 мл ацетона и фильтруют через тот же фильтр. К фильтрату добавляют 40 мл дистиллированной воды, и колбу на 20 мин помещают в морозильную камеру бытового холодильника. Охлажденную смесь фильтруют через плотный ватный томпон в делительную воронку. Остаток в колбе промывают 10 мл холодной смеси ацетон-вода (1:1) и объединяют с фильтратом. Пестициды из смеси ацетон-вода реэкстрагируют в 40 мл хлороформа, встряхивая делительную воронку в течение 2 мин.

После разделения слоев нижнюю фазу фильтруют через бумажный фильтр с помещенным на него безводным натрия сульфатом в фарфоровую чашку или колбу вакуум-ротационного испарителя. Реэкстракцию повторяют. Хлороформные экстракты объединяют и упаривают досуха в токе воздуха или с помощью вакуум-ротационного испарителя. Сухой остаток растворяют в 5 мл этанола (В. В. Карнаухов, 1987).

На пластинки «Силуфол» или «Плазмохром» наносят не более 30 мкл раствора экстракта, подготовленного для хроматографиро-

вания. На линию старта в том же объеме наносят стандартные растворы ожидаемых ФОП концентрацией 0,5 мкг/мл, или 15 нг в пробе. Пластинки помещают в камеру для хроматографирования, в которую за 30 мин до начала разделения заливают подвижный растворитель, который необходимо предварительно подобрать, используя стандартные растворы пестицидов. Для антио и фосфамида может быть рекомендована подвижная система бензол-ацетон (3:2). Величина Rf пестицидов на «Силуфоле» соответственно составит 0,8 и 0,5. Для хлорофоса система гексан-ацетон (1:1) при величине Rf 0,3 при определении валексона, дурсбана, карбофоса, метафоса, метилнитрофоса, фталофоса в качестве подвижного растворителя может быть использован хлороформ.

После подъема фронта растворителя на высоту 10 см пластинки вынимают и сушат при комнатной температуре. После этого проводят активацию пестицидов: пластинки опрыскивают водным раствором брома или воздействуют на них УФ-лучами. При определении хлорофоса пластинку опрыскивают водным раствором аммиака. При применении в качестве активатора водных растворов брома через 15 мин после увлажнения пластинки избыточный бром удаляют путем легкого опрыскивания пластинки 2,5%-ным раствором натрия тиосульфата. Активацию пестицидов УФ-лучами осуществляют облучением пластинки с помощью лампы ПРК-4 с расстояния не более 20 см. При активации хлорофоса водным раствором аммиака его смешивают с 4 частями воды. Раствором пластинку опрыскивают до слабого увлажнения, после чего выдерживают в течение 15 мин при комнатной температуре. Под действием щелочи хлорофос переходит в ДДВФ, который обладает более высокой антихолинэстеразной активностью.

После активации пестицидов пластинки подсушивают при комнатной температуре, опрыскивают свежеприготовленным ферментным раствором и инкубируют в термостате, насыщенном водными парами, при температуре 38 °С в течение 40—60 мин. Для насыщения термостата парами в него ставят чашку Петри, заполненную водой. После инкубации пластинку опрыскивают проявляющим раствором и снова ставят в термостат. ФОП проявляются в виде белых пятен на голубом фоне в течение 10—30 мин.

В качестве химических проявляющих реактивов при определении антио, фосфамида, фозалона и хлорофоса на пластинках «Силуфол» наиболее целесообразно использовать раствор серебра нитрата с 2-феноксиэтанолом. Этот проявляющий реагент готовят следующим образом: в мерной колбе на 100 мл растворяют 1 г серебра нитрата в 2 мл дистиллированной воды, добавляют в колбу 10 мл 2-феноксиэтанола и доводят объем в колбе до метки ацетоном. После этого вводят 2—3 капли пероксида водорода. Пластинки сначала опрыскивают проявляющим реактивом, а затем облучают УФ-лучами, используя лампу ПРК-4. Предел обнаружения составляет для антио, фозалона и фосфамида 0,01 мкг, для хлоро-

фоса — 0,1 мкг. При анализе дурсбана, карбофоса, метафоса и метилнитрофоса наилучшие показатели достигнуты при использовании в качестве проявляющего реагента 0,7%-ного раствора 2,6-дибром-N-хлорхинонимина в гексане или хлороформе с последующим одновременным облучением пластинки УФ- и ИК-лучами. Предел обнаружения пестицидов составляет от 0,05 до 0,1 мкг в пробе.

Количественное определение содержания пестицидов в пробе при анализе посредством ТСХ осуществляют путем сравнения площади пятен и интенсивности их окраски при анализе экстрактов и стандартных растворов. Содержание пестицида в пробе (x, мг/кг) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{AS_2V \cdot 1000}{S_1V_1P},$$

где A — содержание пестицида в стандарте, мкг; S_2 — площадь пятна пробы, мм^2; V — общий объем экстракта, мл; 1000 — коэффициент для пересчета на килограммы; S_1 — площадь пятна стандарта, мм^2; V_1 — объем экстракта, нанесенного на пластинку, мкл; P — масса пробы, взятой для анализа, г.

Определение ФОП методами ГЖХ. Для определения ФОП в патологическом материале, воде, кормах посредством ГЖХ используют отечественные газовые хроматографы серии «Цвет», «Кристалл», «Газохром» или другие аналогичные приборы отечественных и зарубежных марок, оборудованные термоионным (ТИД) или пламенно-фотометрическим детектором (ПФМД).

Подготовка проб к анализу. Экстракцию, очистку, концентрирование экстракта проводят так же, как и для ТСХ. Однако очищенный экстракт, упаренный досуха, растворяют в 5—10 мл ацетона или этанола. Другие органические растворители (гексан, бензол, хлороформ) при сгорании в пламени детектора образуют копоть, загрязняющую приемный электрод, в результате чего падает чувствительность и воспроизводимость метода.

Принцип. Метод основан на разделении смеси пестицидов или других химических веществ на стеклянных колонках, заполненных жидкой фазой на твердом носителе, через которую пропускают инертный газ, чаще всего азот особой чистоты. Разделенные на колонке химические вещества с током газа-носителя поступают в детектор, реагирующий на определенную группу химических соединений. Для анализа ФОП чаще всего используют вариант пламенно-ионизационного детектора (ТИД) с насаженной на горелку таблеткой с цезия бромидом, реагирующим на ФОП. Сигнал с детектора поступает через усилительную систему на самописец или компьютер, который регистрирует сигнал в виде остроконечных пиков, площадь которых пропорциональна количеству вещества, содержащегося в пробе.

В качестве жидкой фазы при анализе антио, валексона, дурсбана, карбофоса, метафоса, метилнитрофоса, фосфамида и фозалона используют 3- или 5%-ный силанизированный метилсилоксан на

хроматоне (SE-30). Применяют также жидкую фазу ХЕ-60 (5%-ную). Колонки стеклянные, 1000 × 3 мм. При анализе неполярных и плохо испаряющихся пестицидов (например, фозалона) газ-носитель — азот особой чистоты со скоростью до 30 мл/мин. Подача водорода — 17—20 мл/мин, воздуха — 300—400 мл/мин. Температуру термостата колонки в зависимости от вида ФОП устанавливают в пределах от 180 до 220 °С, испарителя — 200—220 °С. При определении фозалона температуру термостата колонки и испарителя поддерживают на уровне 230 и 250 °С соответственно. При этих условиях относительное время удерживания (по отношению к метафосу) составляет для антио 1,09 мин, карбофоса и метилнитрофоса — 1,17, фосфамида — 1,25 и фозалона — 7,23 мин.

Для определения хлорофоса и ДДВФ предложен газоадсорбционный метод, отличающийся от метода ГЖХ тем, что разделение пестицидов проводят не на жидкой, а на твердой фазе, в качестве которой используют полисорб-1 (В. В. Лещев, 1975).

При анализе этим методом пробу патологического материала (печень, почки) массой 10 г тщательно измельчают, помещают в склянку с притертой пробкой, заливают 60 мл ацетона, тщательно перемешивают и ставят в холодильник при температуре 4 °С на 1 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую чашку и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 15 мл смеси ацетон-вода 1:1. Экстракцию повторяют дважды. Экстракты объединяют в делительной воронке на 250 мл и экстрагируют 30 мл хлороформа, тщательно взбалтывая воронку в течение 5—7 мин. Нижний (хлороформный) слой сливают в фарфоровую чашку, добавляют в нее 0,5—1,0 мл этанола и упаривают в токе воздуха до 1,5 мл. Упаренный экстракт переносят в мерную пробирку на 5 мл. Чашку промывают 1 мл ацетона, который сливают в ту же пробирку. Объем в пробирке доводят до метки ацетоном и вводят в газовый хроматограф в количестве 5 мкл.

Условия хроматографирования: температура колонки и испарителя 165 °С; скорость тока газа-носителя 22 мл/мин, водорода 14, воздуха 400 мл/мин; время удерживания хлорофоса 1,7 мин, ДДВФ 2,2 мин. Минимально детектируемое количество хлорофоса 0,1 нг, ДДВФ — 0,05 нг. Линейность детектирования сохраняется в пределах от 0,15 до 1,5 нг.

Клиническое значение. Обнаружение в патологическом материале (печень, почки, содержимое желудочно-кишечного тракта) любых количеств ФОП дает основание подозревать, что гибель животных произошла в результате их отравления этими веществами. Однако окончательный диагноз на отравление ФОП может быть поставлен, если данные лабораторного исследования подтверждаются анамнестическими сведениями, клиническими признаками интоксикации (нервно-токсический синдром, миоз зрачка глаз) и результатами патологоанатомического исследования павших животных.

8.3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИРЕТРОИДОВ

Для обработки сельскохозяйственных животных и растений рекомендованы препараты на основе перметрина, циперметрина, дельтаметрина, фенвалерата и др. Большинство синтетических пиретроидов малотоксичны для сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, применяются для обработки в очень низких концентрациях и дозах, сравнительно быстро разрушаются в окружающей среде и организме животных, поэтому отравления пестицидами этой группы очень редки и возможны только в результате грубого нарушения установленных регламентов их применения. Однако синтетические пиретроиды высокотоксичны для рыб и особенно пчел, которые чаще всего могут служить объектами ветеринарного химико-токсикологического исследования. Для определения синтетических пиретроидов в тканях животных (печень, почки, мышцы) и пчелах используют методы на основе ТСХ и ГЖХ.

Принцип. Методы основаны на экстракции пестицидов из измельченной пробы тканей животных, содержимого желудочно-кишечного тракта, кормов с помощью органического растворителя, на очистке экстрактов в системе жидкость—жидкость, дополнительной очистке на колонках с адсорбентами, их концентрировании и определении пестицидов с помощью ТСХ или ГЖХ.

Реактивы: ацетон (ч.);
гексан (ч. д. а.);
эфир диэтиловый (х. ч);
натрия сульфат безводный;
хлороформ (ч.);
ацетонитрил (ч.);
бензол (ч. д. а.);
кальция хлорид (х. ч.);
алюминия оксид для хроматографии II степени активности;
натрия хлорид (ч.);
25%-ный водный раствор аммиака (ч.);
серебра нитрат;
кислота фосформолибденовая (ч. д. а.);
спирт этиловый 96%-ный;
проявляющий реагент для ТСХ: 1) 0,5 г серебра нитрата помещают в колбу на 100 мл, растворяют в 5 мл дистиллированной воды, добавляют 7 мл 25%-ного раствора аммиака и доводят объем в колбе до 100 мл ацетоном. 2) 10%-ная фосформолибденовая кислота в этиловом спирте;

реагент для ГЖХ: неподвижные фазы — 5%-ный SE-30 на хроматоне N-AWHDMC (0,16—0,20 мм); 3%-ный ОУ-1 на хроматоне N-AW (0,125—0,160 мм); азот особой чистоты; основной стандартный раствор пиретроидов в гексане 500 мкг/мл. Хранят в холодильнике в течение 6 мес. Рабочие стандартные растворы пиретро-

идов в гексане или бензоле концентрацией от 0,1 до 100 мкг/мл. Хранят в холодильнике в течение 2 нед.

Оборудование: колбы конические вместимостью 50 и 250 мл; колбы круглодонные со шлифом для отгонки растворителей; делительные воронки на 50, 100 и 250 мл; воронки; колбы мерные; колонки для адсорбционной хроматографии; аппарат для встряхивания колб; вакуум-ротационный испаритель И-1; камера хроматографическая; микропипетки на 0,1, 0,2 мл; хроматоскоп (хемоскоп); пульверизатор стеклянный; микрошприцы на 10 мкл; газовый хроматограф «Цвет», «Кристалл», ЛХМ-2000 с детектором по захвату электронов.

Ход определения. 25 г измельченной ткани (мышцы, печень, почки) или содержимого желудочно-кишечного тракта помещают в коническую колбу, заливают 50 мл ацетона и встряхивают в течение 1 ч на шуттель-аппарате. Фильтруют через бумажный фильтр в другую коническую колбу. Вносят в колбу 50 мл холодной дистиллированной воды и ставят на 1 ч в бытовой холодильник. Затем фильтруют через бумажный фильтр в коническую колбу, добавляют в колбу 30 мл гексана и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 30 мин. Смесь переносят в делительную воронку. Гексановый слой отделяют и переносят в колбу вакуум-ротационного испарителя. Водно-ацетоновый слой дважды промывают 10 мл гексана, который сливают в ту же колбу. Экстракт упаривают досуха. Сухой остаток смывают 3—5 мл гексана, который переносят в мерную пробирку на 10 мл. Колбу еще раз промывают 3 мл гексана и переносят его в ту же пробирку. Сухой остаток растворяют в 200 мкл гексана при анализе посредством ТСХ и в 5 мл при использовании ГЖХ.

При анализе методом ТСХ весь объем экстракта наносят на старт хроматографической пластинки, подсушивая под феном пластинку в точке нанесения экстракта. Пластинку помещают в хроматографическую камеру и проводят развитие в системе гексан-ацетон (4:1). После развития пластинку подсушивают на воздухе, а затем опрыскивают раствором серебра нитрата или фосформолибденовой кислоты. При обработке пластинки раствором серебра нитрата пиретроиды проявляются в виде серо-черных пятен, фосформолибденовой кислоты — синих пятен. Нижний предел обнаружения 3—10 мкг. Величина Rf в среднем составляет для перметрина 0,6, циперметрина 0,4, фенвалерата 0,3 и дельтаметрина 0,5. Количественную оценку содержания инсектицидов проводят путем сравнения размера и интенсивности окрашивания пятен из стандартных растворов и анализируемой пробы.

Расчет количественного содержания проводят по формуле

$$x = \frac{A \cdot 1000}{P},$$

где x — содержание остатков пестицида в пробе, мг/кг; A — количество пестицида, найденное в пробе, мкг; 1000 — коэффициент для пересчета на килограммы; P — масса навески анализируемой пробы, г.

При анализе методом ГЖХ 5 мкл конечного экстракта вводят с помощью микрошприца в газовый хроматограф и проводят анализ при следующих условиях: газовый хроматограф с детектором электронного захвата (ДЭЗ) или постоянной скоростью рекомбинаций, колонка стеклянная 1500 × 4,0 мм, заполненная фазой 3 %-ным ОУ-1 или 5%-ным SE-30 на хроматоне; газ-носитель — азот со скоростью 60 мл/мин; температура термостата колонки, испарителя и детектора соответственно 240, 260 и 260 °С. Время элюирования перметрина 2 мин 13 с, циперметрина — 2 мин 56 с, фенвалерата — 3 мин 20 с. Количественную оценку проводят путем сравнения площадей или высот пиков при хроматографировании стандартных образцов и экстрактов из пробы.

Расчет содержания пестицида проводят по формуле

$$C = \frac{C_{ст} V_2 S}{S_{ст} V_1 P},$$

где C — количество препарата в пробе, мг/кг; $C_{ст}$ — количество пестицида во введенном в хроматограф стандартном растворе, мкг; V_2 — объем анализируемого экстракта после упаривания, мл; S — площадь пика исследуемого раствора, мм^2; $S_{ст}$ — площадь пика стандартного раствора пиретроида, введенного в хроматограф, мм^2; V_1 — объем экстракта, введенного в хроматограф, мл; P — масса навески анализируемой пробы, г.

Клиническое значение. Обнаружение в патологическом материале (печень, почки) синтетических пиретроидов дает основание предполагать возможную интоксикацию животных препаратами из этой группы химических веществ. Однако окончательный диагноз может быть поставлен на основании анализа данных о применении синтетических пиретроидов в качестве средств защиты растений или животных, клинических признаков интоксикации и результатов патологоанатомического исследования.

8.4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ ГРУППЫ 2,4-Д

Гербициды группы 2,4-Д относятся к производным хлорфеноксиуксусной кислоты. Соли и эфиры 2,4-Д используют для борьбы с сорной растительностью на посевах зерновых культур, кормовых трав (клевера, тимофеевки), а также для уничтожения ядовитых растений и кустарников на сенокосных угодьях и пастбищах с нормами расхода до 4 кг/га. Пестициды этой группы относятся к умеренным или малотоксичным веществам с $ЛД_{50}$ для лабораторных животных от 800 до 1500 мг/кг. Имеют низкую токсичность для рыб и пчел. Отравления сельскохозяйственных и диких промысловых животных возможны только при нарушении правил хранения и применения препаратов этой группы. Исследование патологического материала и зеленых растений на остатки гербицидов группы 2,4-Д проводят только в случае, если анамнестические дан-

ные свидетельствуют о их применении для обработки лугов и пастбищ, где выпасали животных, или растений, которые после обработки скармливали животным. Остатки гербицидов определяют в виде кислоты 2,4-Д методами ТСХ и ГЖХ (В. В. Ермаков, А. И. Назаренко, В. И. Плешаков, 1987).

Принцип. Методы основаны на извлечении кислоты 2,4-Д из кормов или патологического материала (печень, почки) смесью хлороформа и диэтилового эфира, реэкстракции соединения раствором натрия гидрокарбоната, переэкстракции диэтиловым эфиром, очистке экстрактов калия перманганатом и определении посредством ТСХ или ГЖХ.

Реактивы: диметилсульфат (ч. д. а.), 5%-ный раствор в перегнанном абсолютном ацетоне. В коническую колбу на 250 мл заливают 95 мл абсолютного ацетона, туда же вливают 5 мл диметилсульфоксида и вносят 10 г безводного калия карбоната;

калия карбонат (ч. д. а.). Соль растирают в порошок, высушивают 6 ч при 100 °С и хранят в эксикаторе над безводным кальция хлоридом;

калия перманганат, 5%-ный водный раствор;

кислота хлористоводородная концентрированная (х. ч.), 1 М и 4 М растворы;

м-крезоловый пурпуровый (ч. д. а.);

натрия гидрокарбонат (х. ч.), 0,3%-ный и 3%-ный растворы;

проявляющий реактив: 200 мг серебра нитрата вносят в колбу на 100 мл, растворяют в 10 мл бидистиллированной воды, добавляют в колбу 34 мл ацетона, вносят 10 мг м-крезолового пурпурового, помещают колбу на водяную баню температурой 80 °С на 15 мин. Хранят во флаконе из темного стекла в течение 1 нед;

серебра нитрата (ч. д. а.);

смесь 3%-ного водного раствора натрия гидрокарбоната и этанола 9:1 по объему;

стандартный раствор 2,4-Д кислоты в ацетоне концентрацией 10, 100, 1000 мкг/мл.

Оборудование: газовый хроматограф с детектором электронного захвата серии «Цвет», ЛХМ-2000, «Кристалл» или аналогичный прибор; пластинки для хроматографии «Силуфол» производства Чехии; «Армсорб» на фольге или стекле; «Плазмохром» на полимере; камера для опрыскивания пластинок; пульверизаторы стеклянные; колба Эрленмейера на 250 мл; микрошприцы на 10 и 100 мкл; колонки стеклянные для анализа метиловых эфиров 2,4-Д с помощью ГЖХ 1500 × 3 мм, заполненные смесью 5%-ного метилсилоксана (SE-30 5 %) и 1%-ного полифенилметилсилоксана (ПФМС-4), нанесенные на силанизированный хроматон; ПФМС-4 растворяют в хлороформе и наносят на готовую фазу SE-30 методом испарения.

Ход определения. 25 г измельченного и растертого или гомогенизированного образца тканей животных вносят в колбу Эр-

ленмейера на 250 мл, добавляют 5 мл концентрированной кислоты хлористоводородной, перемешивают, дополнительно вносят 50 мл смеси хлороформа и диэтилового эфира (2:1) и встряхивают в течение 20 мин. Затем в колбу всыпают 25 г безводного натрия сульфата. Содержимое колбы перемешивают; отстоявшийся растворитель сливают в колбу на 100 мл, пробу промывают 25 мл смеси растворителей. Экстракты объединяют, фильтруют через вату, промытую 5 мл хлороформа в колбу на 500 мл, добавляют 75 мл смеси 3%-ного раствора натрия бикарбоната и этанола (3:1) и встряхивают в течение 30 мин. Содержимое колбы переносят в делительную воронку на 250 мл. Органическую (нижнюю) фазу сливают, а водную промывают 50 мл хлороформа, встряхивают воронку 1 мин. Хлороформ удаляют. Водную фазу фильтруют через ватный тампон, предварительно промытый 2%-ным раствором натрия бикарбоната, в колбу на 100 мл, куда предварительно вносят 7,5 мл 4 М соляной кислоты.

После окончания реакции выделения диоксида углерода кислый раствор (pH 2) переносят в делительную воронку, в которую добавляют 50 мл эфира. Воронку энергично встряхивают в течение 5 мин. Экстракт фильтруют через ватный тампон и слой (1 см) безводного натрия сульфата в фарфоровую выпарительную чашку или колбу вакуум-ротационного испарителя. Экстракцию повторяют 25 мл эфира, который фильтруют в ту же чашку или колбу. Фильтр промывают 10 мл эфира. Эфир упаривают в токе воздуха, а затем на водяной бане при 60 °С или с помощью вакуум-ротационного испарителя досуха.

При анализе 2,4-Д с помощью ТСХ сухой остаток после упаривания экстракта растворяют в 0,2—0,3 мл хлороформа и наносят с помощью микропипетки или микрошприца на старт хроматографической пластинки с параллельным нанесением на линию старта 5 и 10 мкг (5 и 10 мкл) 2,4-Д кислоты концентрации 10 мкг/мл. В качестве подвижной фазы используют систему циклогексан-уксусная кислота-бензол в соотношении 4:2:1. После разделения пластинку нагревают в течение 10 мин при температуре 130 °С, а затем опрыскивают проявляющим реактивом, после чего еще раз помещают в сушильный шкаф. 2,4-Д проявляется в виде малиновых пятен на желтом фоне с величиной Rf 0,54. Через 12 ч при хранении пластинок на свету пятна становятся темно-коричневыми. Количественную оценку содержания гербицида в пробе проводят путем сравнения величины и интенсивности окраски пятен, полученных из экстракта и стандартного раствора.

При определении 2,4-Д посредством ГЖХ предварительно проводят метилирование гербицида, содержащегося в сухом остатке. Для этого в колбу с сухим остатком приливают 3 мл 5%-ного раствора диметилсульфата в абсолютном метиловом спирте, тщательно ополаскивают стенки колбы, вносят в колбу 1 г безводного натрия сульфата, присоединяют к колбе обратный холодильник и поме-

щают на водяную баню температурой 55 °С на 10 мин. После окончания реакции метилирования колбу охлаждают под током водопроводной воды, прибавляют 3 мл насыщенного водного раствора натрия хлорида и 5 мл гексана. Содержимое колбы переносят в делительную воронку на 100 мл, используя 80 мл дистиллированной воды. Метиловые эфиры экстрагируют путем встряхивания воронки в течение 2 мин. После разделения слоев водную фазу удаляют, а гексановый экстракт встряхивают с 15 мл насыщенного раствора натрия хлорида. Органический экстракт переносят в пробирку с притертой пробкой и 5 мкл раствора вводят в газовый хроматограф.

Одновременно готовят стандартный раствор кислоты 2,4-Д. Для этого в колбы вакуум-ротационного испарителя вносят 1, 5 и 10 мг (0,1, 0,5 и 1,0 мл) стандартного раствора 2,4-Д концентрацией 10 мкг/мл. Растворитель упаривают досуха, а пестицид метилируют так же, как и в экстрактах из проб.

Клиническое значение. Обнаружение остатков гербицидов группы 2,4-Д в кормах и содержимом кишечника на уровне, превышающем 50 мг/кг, и в печени более 5 мг/кг служит основанием для постановки диагноза на отравление. Окончательный диагноз на отравление гербицидами этой группы ставят в случае подтверждения данных лабораторного исследования анамнестическими сведениями, клиническими признаками интоксикации (угнетение, отсутствие аппетита, учащенное дыхание, тимпания и скрежет зубами у крупного рогатого скота), а также результатами патолого-анатомического вскрытия павших животных (зернистая и жировая дегенерация печени и почек, гиперемия и кровоизлияния во внутренних органах).

8.5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РОДЕНТИЦИДОВ (ЗООКУМАРИНА, БРОМАДИОЛОНА, БРОДИФАКУМА, ЦИНКА ФОСФИДА)

Для борьбы с грызунами на животноводческих фермах наиболее широко применяют родентициды из группы антикоагулянтов, производные 4-оксикумарина (зоокумарин, бромадиолон, бродифакум), а также препараты на основе 1,3-индандиона (дифенацин, этилфенацин, изоиндан, хлорфасинон). Все они относятся к ядам кумулятивного действия. Кроме того, в последние годы разрешен к применению яд острого действия — цинка фосфид.

Все родентициды относятся к первому классу опасности и могут быть причиной отравлений сельскохозяйственных животных, в том числе птиц. Родентициды из группы антикоагулянтов имеют сравнительно низкую токсичность для птиц. Наиболее часто отравления пестицидами этой группы регистрируются среди свиней в результате поедания небрежно разложенных отравленных приманок. Цинка фосфид высокотоксичен для млекопитающих и птиц,

поэтому отравления этим родентицидом регистрируют у сельскохозяйственных и диких животных всех групп.

Определение зоокумарина в кормах, тканях животных и отравленных приманках (по М. Ф. Болоховец, В. В. Ермакову, 1987).

Зоокумарин — белое кристаллическое вещество, почти нерастворимое в воде и бензоле, растворимое в ацетоне и диоксане. $ЛД_{50}$ для крыс 4—8 мг/кг, для свиней — 10 мг/кг. Малотоксичен для кур. Выпускают в виде порошка с концентрацией действующего вещества 0,5—1 % с наполнителем, в качестве которого используют крахмал или тальк. Применяют для уничтожения серых крыс и домовых мышей в населенных пунктах, животноводческих помещениях, складах в виде отравленных приманок 5%-ной концентрации по препарату. Отмечены случаи отравления свиней. Кумариноподобные соединения содержат некоторые растения и образуют микроскопические грибы (плесени). Поэтому необходимо ставить дифференциальный диагноз на отравление.

Принцип. Хроматографические методы основаны на извлечении зоокумарина из кормов и биологического материала органическим растворителем, очистке экстрактов на колонке с алюминия оксидом и последующем определении зооцида в закрепленном слое силикагеля по реакции диазосочетания или в виде метилового эфира на газовом хроматографе с детектором электронного захвата.

Спектрофотометрический метод основан на извлечении зооцида из отравленных приманок, кормов или тканей животных хлороформом с последующей очисткой на колонке с алюминия оксидом и определении натриевой соли зоокумарина по характерному поглощению света в УФ-области спектра при 308 нм.

Метрологические характеристики методов: нижний предел определения методом ТСХ — 2 мкг, или 0,2 мг/кг зоокумарина в пробе, методом ГЖХ — 1 нг, или 0,02 мг/кг, степень определения — 80 %; спектрофотометрическим методом — 10 мг/кг корма, 0,4 мг/кг мышечной ткани и крови животных.

Реактивы: аммиак водный 25%-ный (ч. д. а.);

ацетон абсолютный. 0,5 л ацетона встряхивают 30 мин с 50 г безводного кальция хлорида, а затем перегоняют на кипящей водяной бане; первые и последние 50 мл дистиллята отбрасывают, а остальное количество собирают в склянку с притертой пробкой. Хранят без доступа воздуха;

диметилсульфат;

2,4-дихлоранилин, насыщенный раствор в 0,33 М соляной кислоты. 1 г вещества смешивают со 100 мл 0,33 М кислоты хлористоводородной и встряхивают 1 ч. Хранят в склянке из темного стекла в холодильнике до 3 мес;

зоокумарин, основной раствор — 1 мг/л. 100 мг зооцида растворяют в 100 мл ацетона;

зоокумарина стандартный раствор для УФ-спектрофотометрии, 0,1 мг/мл. 10 мг зооцида растворяют в 2%-ном растворе натрия гидроксида в мерной колбе на 100 мл;

кальция хлорид безводный (ч. д. а.);

калия карбонат (ч. д. а.). Соль растирают в порошок, прокаливают 6 ч при 160 °С и хранят в эксикаторе над безводным кальция хлоридом;

натрия нитрит (х. ч.), 1%-ный водный раствор свежеприготовленный;

реагент метилирующий. В колбу на 100 мл вносят 5 г безводного калия карбоната, 47,5 мл абсолютного ацетона и 2,5 мл диметилсульфата. Готовят в день употребления;

проявляющий реактив. Смешивают 2,5 мл 1 %-ного водного раствора натрия нитрита с 25 мл насыщенного раствора 2,4-дихлоранилина в 0,33 М кислоте хлористоводородной. Готовят 1 раз в неделю;

подвижный растворитель гексан-ацетон 2:1 (по объему).

Оборудование: аналитические весы, шуттель-аппарат; хроматографические камеры; эксикатор; спектрофотометр СФ-4а или другой аналогичный прибор для измерения поглощения в УФ-области спектра; колбы Эрленмейера на 50, 100 и 250 мл; чашки для выпаривания № 5 и 10; мерные цилиндры на 50 и 100 мл; мерные колбы на 100 мл; пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл; микропипетки на 0,1 мл; воронки для фильтрования № 3 и 5; пластинки стеклянные размером 9 × 12 см; пробирки длиной 15 см, диаметром 1,5 см, градуированные на 15 мл; колонки стеклянные для хроматографии длиной 35 см, с внутренним диаметром 1,5 см. В качестве колонки можно использовать нижнюю часть бюретки на 100 мл, разрезав ее пополам; газовый хроматограф серии «Цвет-500», ЛХМ-2000 или аналогичный прибор с детектором электронного захвата; колонка насадочная для газовой хроматографии стеклянная длиной 0,75 м, диаметром 3 мм с фазой 5 % SE-30 на силанизированном хроматоне 80—100 меш; микрошприцы на 10 мкл; баня водяная; мельница шаровая; ступка фарфоровая; готовые к употреблению пластинки для ТСХ типа «Силуфол», «Плазмохром», «Армсорб».

Ход определения. Для постановки диагноза на отравление зоокумарином исследуют пробы мышечной ткани, печени и почек. Навеску пробы массой 25 г гомогенизируют, помещают в колбу Эрленмейера на 250 мл. В эту же колбу вносят 10 мл 1 н. серной кислоты. Содержимое перемешивают, добавляют 75 мл хлороформа и встряхивают на шуттель-аппарате 40 мин. Затем в колбу вносят через фильтровальную воронку небольшими порциями (чтобы избежать образования комков) 65 г натрия сульфата. Отделившийся хлороформный экстракт фильтруют в колбу на 200 мл через тампон стекловаты (или обычной ваты). Извлечение зоокумарина повторяют еще раз 50 мл хлороформа, повторяя встряхивание кол-

бы в течение 15 мин. Экстракт фильтруют через ватный тампон в колбу на 200 мл.

Объединенный экстракт пропускают через колонку, которую готовят следующим образом. В нижнюю часть колонки помещают слой ваты (1 см), вносят 10 г алюминия оксида, промывают 20 мл хлороформа и заливают очищенный экстракт. После того как весь экстракт опустится до адсорбента, колонку промывают 100 мл хлороформа, а затем 20 мл ацетона. Зоокумарин элюируют с колонки 50 мл смеси ацетона и 2%-ного раствора натрия гидроксида (47:3). Элюат собирают в фарфоровую чашку № 10, добавляют 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и упаривают досуха на кипящей водяной бане. Для определения зоокумарина на спектрофотометре уксусную кислоту не добавляют.

Определение зоокумарина с помощью ТСХ. Сухой остаток после выпаривания растворяют в 0,5 мл ацетона и полностью наносят в одну точку с помощью микропипетки или пипетки Пастера на старт хроматографической пластинки. Одновременно готовят стандарты, внося в фарфоровую чашку 5—10 мкг вещества, что соответствует 0,5—1,0 мл рабочего раствора зоокумарина. Образцы наносят на пластинки в следующей последовательности: стандарт (5 мкг), образец (1-я повторность), образец (2-я повторность), стандарт (10 мкг). Размер пятна не должен превышать 0,5 $см^2$. Места нанесения проб располагают на расстоянии 1,0—2,0 см друг от друга и от нижнего и боковых краев пластинки; пятна не должны погружаться в растворитель.

В камеру для хроматографирования наливают 60 мл смеси гексана и ацетона (2:1) и через 20 мин помещают в нее пластинку в вертикальном положении. Камеру герметично закрывают. Хроматографирование проводят при температуре не ниже 20 °С. После того как растворитель поднимется на высоту 8—9 см, пластинку вынимают, отмечают фронт растворителя и помещают в сушильный шкаф при 105 °С на 3 мин. Затем пластинку охлаждают и опрыскивают из пульверизатора проявляющим реагентом, вновь высушивают при тех же условиях и помещают в эксикатор над парами аммиака на 1 мин. Зоокумарин проявляется в виде коричневых пятен на желтом фоне с Rf 0,4—0,5 в тонком слое силикагеля и Rf 0,29—0,35 на «Силуфоле». Количество пестицида в пробе определяют сравнением интенсивности окраски и площади пятна стандарта и образца. В случае если содержание зооцида в пробе превышает 10 мкг, следует получить хроматограмму стандартов бóльшей концентрации (20—100 мкг).

Расчет. Содержание зоокумарина в исследуемой пробе (x, мг/кг) вычисляют по формуле

$$x = \frac{A}{P},$$

где A — содержание зоокумарина в исследуемой навеске, мкг; P — масса пробы, г.

Определение зоокумарина с помощью ГЖХ. Полученный после выпаривания остаток растворяют в 3 мл метилирующего реагента и переносят в пробирку длиной 15 см, диаметром 1,5 см, содержащую 500 мг безводного калия карбоната. Пробирку закрывают ватным тампоном и выдерживают в водяной бане при 65 °С в течение 15 мин. Затем содержимое переносят в делительную воронку на 100 мл посредством 30 мл дистиллированной воды и 5 мл гексана. Метиловый эфир зоокумарина экстрагируют путем встряхивания делительной воронки в течение 2 мин. Водную фазу отбрасывают, экстракт промывают 15 мл насыщенного раствора натрия хлорида и сливают в сухую пробирку.

В испаритель газового хроматографа вводят 5 мкл экстракта и проводят хроматографирование при следующих условиях: расход газа-носителя 80 мл/мин, поддув 120 мл/мин; температура термостата детектора, колонки и испарителя 250, 225 и 250 °С соответственно; чувствительность электрометра $1 \cdot 10^{-11}$ А; скорость протяжки ленты самописца 1 см/мин; время удерживания метилового эфира зоокумарина 2,5 мин; высота пика при введении в испаритель 10 нг вещества 80 мм; линейный диапазон от 5 до 25 нг.

Количественное определение проводят методом абсолютной калибровки по градуировочному графику, по высоте пика. График строят в интервале концентраций от 5 до 25 нг зоокумарина. С этой целью в фарфоровые чашки вносят 5, 10 и 20 нг зоокумарина в ацетоне. Ацетон выпаривают, а остаток метилируют, как и пробы. Введение в испаритель хроматографа 5 мкл гексанового экстракта соответствует детектированию 5, 10 и 20 нг зооцида.

Расчет. Содержание зоокумарина в анализируемой пробе (x, мг/кг) находят по формуле

$$x = \frac{C_к V_1}{V_2 P},$$

где $C_к$ — количество вещества, найденное по градуировочному графику, нг; V_1 — объем экстракта, мл; V_2 — объем экстракта, вводимого в газовый хроматограф, мкл; P — масса анализируемой пробы, г.

Спектрофотометрическое определение зоокумарина в мышечной ткани животных. Полученный после выпаривания экстракта остаток в фарфоровой чашке растворяют в 4 мл 2%-ного раствора натрия гидроксида, фильтруют через бумажный фильтр в пробирку и измеряют оптическую плотность при 308 нм. Для сравнения используют пробу мышечной ткани здорового животного того же вида.

Расчет. Концентрацию зоокумарина в образце (x, мг/кг) вычисляют по формуле

$$x = \frac{CV}{V_1 P},$$

где C — содержание зоокумарина, найденное по градуировочному графику, мкг; V — общий объем раствора препарата, мл; V_1 — объем раствора, взятого для анализа, мл; P — масса анализируемого образца, г.

Клиническое значение. Предварительный лабораторный диагноз на отравление зоокумарином может быть поставлен при обнаружении в мышечной ткани остатков зооцида в количестве 5—10 мг/кг. Окончательный диагноз ставят по результатам сопоставления данных лабораторного исследования с клиническими признаками интоксикации (кровянистые истечения из носа и анального отверстия, образование подкожных гематом, понижение свертываемости крови), а также по характерным патологоанатомическим изменениям (множественные кровоизлияния во внутренние органы, гематомы в подкожной клетчатке, карпальных и тарзальных суставах).

Определение цинка фосфида в патологическом материале (А. В. Николаев, 1968, А. Ф. Башмурин, 1968). Цинка фосфид (фосфористый цинк, Zn_3P_2) — темно-серый порошок с запахом чеснока. Технический продукт содержит 14—18 % фосфора, 70—80 цинка и до 6 % нерастворимого осадка. Относится к I классу токсичности с $ЛД_{50}$ для серых крыс 15—30 мг/кг, для кроликов 20—25, для кур 28—30, для крупного рогатого скота, овец, коз, свиней 55—60 мг/кг. В прошлые годы широко применяли для борьбы с мышевидными грызунами на животноводческих фермах, складах, а также для уничтожения полевых грызунов и сусликов на посевах различных сельскохозяйственных культур, лугах, пастбищах. В настоящее время его применение в растениеводстве не разрешено, однако он зарегистрирован для борьбы с мышевидными грызунами в населенных пунктах. Применяется в виде отравленных приманок, содержащих 5 % цинка фосфида. Отмечены случаи отравлений сельскохозяйственных, диких промысловых животных, в том числе птиц, в результате поедания отравленных приманок.

Принцип. Метод основан на определении в содержимом желудочно-кишечного тракта животных фосфористого водорода, выделяющегося из цинка фосфида в кислой среде по реакции с серебра нитратом или ртути бромидом, а также аммония молибдатом.

Реактивы: 10%-ный водный раствор кислоты винной;
5%-ный водный раствор серебра нитрата;
2 н. раствор хлористоводородной кислоты;
бензол (х. ч.);
олова дихлорид;
аммония молибдат (х. ч.);
натрия сульфат безводный;
2,4-дихлорфенол.

Оборудование: прибор Зангера — Блека; прибор для отгонки растворителей; ФЭК; делительные воронки на 250 мл; колбы различной вместимости; баня водяная.

Ход определения. Отравленные приманки, корма, подозреваемые в загрязнении цинка фосфидом, тщательно измельчают, отбирают пробу массой 200 г, смешивают с дистиллированной водой до консистенции густой кашицы. Содержимое желудочно-кишеч-

ного тракта берут в том же количестве без добавления воды. Пробы помещают в круглодонные колбы на 500—1000 мл. Колбу подсоединяют к аппарату для дистилляции, предварительно подкисляя пробу 15—20 мл 10%-ного раствора кислоты винной. Перегонку производят так же, как и при анализе синильной кислоты. Собирают 50 мл дистиллята.

При анализе фосфинов с помощью прибора Зангера — Блека дистиллят в полном объеме заливают в приемную колбу прибора. Туда же помещают три гранулы цинка без мышьяка. В прибор вкладывают реактивную бумагу, пропитанную 5%-ным водным раствором серебра нитрата. Затем в колбу вносят 10 мл концентрированной серной кислоты. Прибор ставят на 1 ч. После того как таблетки цинка перейдут полностью в растворимую соль, извлекают реактивную бумагу. При наличии фосфина в количестве 0,2 мкг бумага приобретает коричневую окраску, при 0,5 — темно-коричневую, при 1,0 — черную, при 2 мкг — черную с металлическим блеском.

При использовании колориметрического метода 10 мл дистиллята помещают в делительную воронку, подкисляют 2 н. раствором кислоты хлористоводородной до pH 3—4, вносят в воронку 40 мл бензола и проводят экстракцию путем встряхивания воронки в течение 20—30 мин. Бензольный слой отделяют, промывают несколько раз дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды не будут содержать фосфат-ионы (PO_4). Для их определения в 50 мл промывной воды добавляют 2 мл молибденового реактива и 2 капли раствора олова дихлорида. Если интенсивность окрашивания не отличается от холостой пробы, промывание заканчивают. 10 мл бензольного раствора помещают в мерную колбу на 50 мл, добавляют в нее 10 мл окислительной смеси, закрывают колбу пробкой и встряхивают в течение 10 мин. Затем ставят ее в водяную баню и отгоняют бензол. Избыток калия перманганата и выпавший в осадок марганца диоксид восстанавливают добавлением по каплям раствора натрия сульфата безводного или гидроксиламина хлорида. Раствор кипятят на плитке в течение 2—3 мин, затем охлаждают, добавляют 3 капли индикатора (2,4-динитрофенол) и по каплям аммиак, разведенный 1:10, до желтого окрашивания. Объем раствора доводят до 45 мл дистиллированной водой, прибавляют 2 мл молибденового реактива. Раствору дают постоять 10 мин, измеряют оптическую плотность раствора по отношению к холостой пробе, содержащей все реактивы и проведенной через все этапы анализа.

Оптическую плотность раствора измеряют на ФЭК-56 с красным светофильтром. При низком содержании фосфина используют кюветы длиной 50 мм, при повышенном —20 мм. Количество фосфина в аликвотной части определяют по калибровочной кривой, которую строят на стандартных растворах желтого фосфора, растворенного в бензоле.

Клиническое значение. Обнаружение любых количеств фосфина в содержимом желудочно-кишечного тракта позволяет подозревать отравление животных цинка фосфидом. Однако окончательный диагноз может быть поставлен на основании анализа анамнестических данных (использование цинка фосфида для дератизации), клинической картины заболевания (позыв на рвоту у свиней, выпячивание глазных яблок, расширение зрачков, пенистые выделения из носа), а также результатов патологоанатомического вскрытия (чесночный запах содержимого желудочно-кишечного тракта, кровоизлияния в подслизистую оболочку желудка и кишечника, под капсулу печени и почек).

8.6. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКОТОКСИНОВ

Микотоксины — продукты жизнедеятельности микроскопических грибов (плесеней), поражающих зерновые и другие сельскохозяйственные культуры в процессе их вегетации или хранения. Выделено и изучено более 100 микотоксинов, однако практическое значение имеет лишь небольшая их часть. Для России наибольшее санитарно-токсикологическое значение представляют Т-2-токсин, дезоксиниваленол (вомитоксин), охратоксин А, афлатоксин B_1 и некоторые другие.

Большинство микотоксинов высокотоксичны для животных и относятся к I или II классу опасности с величиной $ЛД_{50}$ для лабораторных животных менее 50 мг/кг. Отдельные микотоксины обладают дерматонекротическим, гепато-, эмбриотоксическим и тератогенным действием. Микотоксины сравнительно быстро разрушаются в организме животных, практически не накапливаются в их органах и тканях, некоторые из них в небольших количествах могут выделяться с молоком. Поэтому основной метод диагностики микотоксикозов — биологическое или химико-аналитическое исследование на содержание микотоксинов в зернофураже, грубых кормах, пораженных плесенью, а также жмыхах и шротах.

Для определения микотоксинов в кормах используют методы на основе тонкослойной (ТСХ), газожидкостной (ГЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В последние годы для этой цели стали широко применять методы на основе иммуноферментного анализа (ИФА).

Определение Т-2-токсина в кормах с применением иммуноферментного анализа. Метод разработан Г. П. Кононенко, А. А. Буркиным, Н. А. Соболевой (1996) и утвержден Департаментом ветеринарии МСХ РФ. Предназначен для количественного определения Т-2-токсина в кормовом сырье и готовых кормовых смесях, выполняется с применением иммуноферментного анализа (ИФА) и позволяет определять содержание Т-2-токсина в пробах до уровня 35 мкг/кг.

Краткая характеристика определяемого вещества. Т-2-токсин [3-окси-4,15-диацетокси-8-(3-метилбутирилокси)-12,13-эпокситрихотец-9ен], продуцируемый грибами рода Fusarium при поражении различных сельскохозяйственных культур (зерновых, зернобобовых, пастбищных трав), относится к группе высокотоксичных микотоксинов с $ЛД_{50}$ для лабораторных животных от 4,0 до 10,0 мг/кг. При попадании внутрь с кормами в дозах, превышающих 100 мкг/кг корма, развивается воспаление и изъязвление слизистой оболочки ротовой полости, носа, губ и языка с одновременным развитием лейкопении, увеличением протромбинового времени.

Наиболее часто Т-2-токсикоз возникает при использовании в корм животным зерна и соломы, длительное время хранившихся в валках или перезимовавших под снегом и пораженных грибами F. sporotrichioides.

Принцип. Метод состоит в извлечении Т-2-токсина из размолотого образца смесью ацетонитрила и воды, очистке экстракта на колонке, заполненной сорбентом, и оценке количественного содержания Т-2-токсина методом твердофазного конкурентного ИФА с определением интенсивности окрашенных комплексов с помощью фотометра с вертикальным лучом.

Реактивы: ацетонитрил (ч.);

спирт этиловый;

кислота серная (ч.);

вода дистиллированная;

адсорбент для очистки экстрактов марки К-3 [поставщик ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, ВНИИВСГЭ, 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, тел.(095) 256-66-22];

Т-2-токсин;

аналитический стандарт для ИФА (поставщик ВНИИВСГЭ);

диагностический набор Т-2-токсин-ИФА из 8 реактивов: Т-2-АГ, Т-2-АТ, ФК, «БУФЕР-ОТ» (концентрат), «БУФЕР-Р1» (концентрат), «БУФЕР-Р2» (концентрат), «Субстрат», ФДА. Поставщик ООО «Фарматек», 119332, г. Москва, ул. Московская, д. 47;

смесь для экстракции ацетонитрил-вода (425:65);

рабочий раствор серной кислоты: кислота-вода (20:80);

рабочий раствор из реактива «БУФЕР-ОТ» (концентрат). 57 мл воды заливают в колбу на 250 мл и добавляют 3 мл реактива «БУФЕР-ОТ» (концентрат). Колбу встряхивают, наносят маркировку «ОТ».

Оборудование: мельница МРП-1; делитель БИС-1; весы лабораторные технические типа ВЛКТ; фотометр АКИЦ-1; холодильник бытовой; планшеты полистироловые для ИФА, наборные; дозатор с регулировкой для отбора жидкостей на 0,2—1,0 мл; микродозатор для отбора жидкостей на 0,02—0,2 мл; комплект съемных наконечников; штатив лабораторный; резиновая груша № 1; фильтры бумажные с синей лентой; пипетки пастера стек-

лянные; колбы на 250 и 1000 мл; цилиндры мерные на 25, 100, 500 и 1000 мл; пробирки П-1-10-0,1 ХС.

Подготовка ячеек планшета. Ячейки планшета заполнить водой и сразу слить ее встряхиванием перевернутого планшета. В каждую ячейку внести по 0,2 мл этилового спирта и через 1 мин слить его встряхиванием. Вновь залить ячейки водой и через 1 мин слить ее встряхиванием.

Приготовление рабочего раствора реактива Т-2-АГ. 3,2 мл воды залить в коническую пробирку, затем туда же влить 0,8 мл реактива «БУФЕР-Р1» (концентрат), после этого в пробирку залить 0,02 мл реактива Т-2-АГ. Раствор перемешать и нанести маркировку «АГ». Во все ячейки планшета залить по 0,2 мл рабочего раствора АГ. Планшет накрыть крышкой и поместить его на 16 ч в бытовой холодильник.

Ход определения. Измельченную пробу корма массой 25 г помещают в колбу на 250 мл, заливают 125 мл смеси для экстракции, колбу встряхивают 3—4 раза круговыми движениями и выдерживают в течение 16 ч при комнатной температуре. После этого содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр с синей лентой во вторую колбу на 250 мл. Экстракт подвергают колоночной очистке. Для этого в сужающуюся часть закрепленной в штативе пипетки Пастера вкладывают вату, уплотняют ее таким образом, чтобы толщина слоя не превышала 0,3—0,5 см. Засыпают в колонку 1,0 г адсорбента К-3, слой слегка уплотняют постукиванием колонки, а затем вносят в колонку 0,5 мл экстракционной смеси. Колонка готова к работе, как только жидкость опустится до поверхности наполнителя.

Под колонку устанавливают коническую пробирку. После этого с помощью дозатора вносят в колонку 1,0 мл экстракта и продавливают его через слой адсорбента с помощью резиновой груши таким образом, чтобы скорость вытекания экстракта не превышала 1 капля/с. Как только уровень жидкости опустится до уровня поверхности наполнителя, в колонку добавляют 1,0 мл смеси для экстракции и продавливают ее через адсорбент в том же режиме.

После инкубации в холодильнике планшета с рабочим раствором «АГ» раствор сливают встряхиванием. Затем в каждую ячейку микродозатором вносят по 0,25 мл раствора «ОТ», выдерживают в течение 2 мин и сливают встряхиванием. Процедуру повторяют еще 3 раза.

Приготовление рабочего раствора из реактива «БУФЕР-Р2» (концентрат). 9,6 мл дистиллированной воды заливают в коническую пробирку, добавляют 0,4 мл реактива «БУФЕР-Р2» (концентрат), перемешивают и наносят маркировку «Р2».

Приготовление рабочего раствора очищенного экстракта. Микродозатором 0,27 мл раствора Р2 вносят в коническую пробирку, добавляют 0,03 мл очищенного экстракта. Содержимое перемешивают и наносят маркировку, соответствующую номеру пробы.

Приготовление растворов из реактива Т-2-токсин, аналитический стандарт. В 3 конические пробирки микродозатором заливают 0,27, 0,12 и 0,12 мл смеси для экстракции. Затем 0,03 мл реактива Т-2-токсин, аналитический стандарт добавляют в первую пробирку, перемешивают и ставят маркировку «С1». С использованием нового наконечника 0,03 мл раствора С1 заливают во вторую пробирку, содержащую 0,12 мл смеси, перемешивают и наносят маркировку «С2». 0,03 мл смеси С2 заливают в третью пробирку и наносят маркировку «С3».

Приготовление рабочих растворов для калибровки. В 3 конические пробирки внести по 0,27 мл раствора Р2, по 0,03 мл растворов С1, С2 и С3 соответственно и нанести маркировки «К1», «К2» и «К3» в соответствии с цифрами в маркировках вносимых растворов. В четвертую пробирку отмерить дважды по 0,27 мл раствора Р2 и залить туда же 0,03 мл смеси для экстракции, нанести маркировку «К0« и перемешать.

Заполнение ячеек с маркировкой «0» и «К0». Микродозатором в 3 ячейки, обозначенные на контуре значками «0» и «К0», внести по 0,1 мл раствора К0, а в ячейку «0» добавить еще 0,1 мл раствора Р2.

Внесение в ячейки рабочих растворов для калибровки очищенных экстрактов. В ячейки, обозначенные на контуре значками «К-1», «К-2» и «К3», внести по 0,1 мл растворов К1, К2 и К3, в ячейки, обозначенные на контуре значками «№ пробы», — по 0,1 мл рабочих растворов очищенных экстрактов.

Приготовление рабочего раствора из реактива Т-2-АТ. Дозатором отмерить 2,0 мл раствора Р2 и внести его в коническую пробирку. В ту же пробирку добавить 0,4 мл реактива Т-2-АТ, нанести маркировку «АТ» и перемешать.

Внесение рабочего раствора АТ в ячейки. Во все ячейки, кроме одной, обозначенной на контуре значком «0», вносят по 0,1 мл раствора АТ.

Инкубация. Планшет аккуратно встряхивают, накрывают крышкой и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, встряхивая его вручную через каждые 10—15 мин.

Отмывка. Раствор из ячеек слить встряхиванием. Во все ячейки внести по 0,25 мл раствора ОТ, оставить на 2 мин и слить встряхиванием. Процедуру повторить еще 3 раза.

Приготовление рабочего раствора из реактива ФК. 4,0 мл раствора Р2 внести в коническую пробирку, туда же влить 0,02 мл реактива ФК (концентрат), нанести маркировку «ФК». Во все ячейки внести по 0,2 мл рабочего раствора ФК.

Инкубация и отмывка. Планшет аккуратно встряхнуть, накрыть крышкой и выдержать 1 ч при комнатной температуре, встряхивая через каждые 10—15 мин, после чего слить встряхиванием. После этого планшет отмывают раствором ОТ, как это сделано выше.

Приготовление раствора для ферментативной реакции. 3,6 мл дистиллированной воды залить в коническую пробирку, добавить

в нее 0,4 мл реактива «Субстрат» (концентрат) и 0,02 мл реактива ФДА. Перемешать, нанести маркировку «субстрат».

Проведение ферментативной реакции. По 0,2 мл раствора «субстрат» внести во все ячейки. Планшет накрыть крышкой и выдержать в течение 45 мин в темноте при комнатной температуре.

Остановка реакции. Во все ячейки внести по 0,05 мл рабочего раствора серной кислоты, планшет аккуратно встряхнуть и через 10 мин приступить к измерению оптической плотности окрашенного комплекса.

Учет реакции. Планшет поместить в фотометр, навести на ячейку «0» и выставить ноль прибора. Последовательно перемещая планшет по ячейкам, измерить оптическую плотность раствора в каждой ячейке и записать результат. По двум значениям оптической плотности для каждого варианта найти среднюю величину. Среднее значение оптической плотности в «К0» принять за 100 % связывания. Для каждого варианта рассчитать процент связывания по формуле

$$\% \text{ связывания} = \frac{\text{Среднее оптич. плотности варианта}}{\text{Среднее оптич. плотности «К0»}} \cdot 100.$$

По значениям процентов связывания для вариантов К1, К2, К3 на оси ординат и соответствующим значениям десятичных логарифмов концентрации (мкг/мл) рабочих растворов Т-2-токсина для калибровки (−2,00; −2,70; −3,40) на оси абсцисс провести калибровочную прямую от 10 до 90 % связывания. По значениям процентов связывания для остальных вариантов с помощью калибровочной прямой найти значения логарифмов концентраций Т-2-токсина в рабочих растворах [(с) мкг/мл] и рассчитать его содержание в пробах по формуле

$$(\text{с}) \text{ мкг/кг} = (\text{с}) \text{ мкг/мл} \cdot 10^5.$$

Клиническое значение. Обнаружение в кормах Т-2-токсина в количествах, превышающих 100 мкг/кг корма, служит основанием для постановки предварительного диагноза на Т-2-токсикоз. Однако окончательный диагноз может быть поставлен только после изучения клинической картины интоксикации и результатов патологоанатомического вскрытия. Кроме того, результаты химико-аналитического исследования целесообразно подтвердить постановкой кожной пробы на кролике. Для этого на выстриженную кожу кролика наносят концентрированные ацетоновые или эфирные экстракты из кормов. При наличии в пробах Т-2-токсина в количествах, способных вызвать клиническую картину интоксикации, через 2—3 дня после нанесения развивается резкая гиперемия, отек с утолщением кожи и последующим образованием язв.

Определение дезоксиниваленола в зерне с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Метод разработан Г. П. Кононенко, Н. А. Соболевой, Е. В. Зотовой,

А. Н. Леоновым, С. Н. Ланиным, В. В. Петренко (1995) и рекомендован отделением ветеринарной медицины РАСХН.

Дезоксиниваленол (вомитоксин, 3,7,15-триокси-12,13-эпокситрихотец-9-ен-8-он) относится к классу высокотоксичных микотоксинов с $ЛД_{50}$ для лабораторных животных 40—50 мг/кг. Микотоксин продуцируют грибы Fusarium (F. qraminearum, F. culmorum). Ареал распространения грибов-продуцентов ограничивается южными регионами России. Образование микотоксина происходит на вегетирующих зерновых культурах при их поражении фузариозом, главным образом на пшенице и ячмене. Широкое распространение фузариоза зерновых культур имело место в 1980 г. в ряде провинций Канады, в 1982 г. в штате Канзас (США), в 1986 и 1987 гг. в Краснодарском крае России.

Принцип. Метод основан на экстракции микотоксина из размолотого зерна или муки смесью ацетонитрила и воды, колоночной очистке экстракта на смеси активированного угля и цеолита с последующим определением содержания микотоксина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 224 нм.

Реактивы: ацетонитрил (ч.);
вода дистиллированная;
спирт изопропиловый (ч.);
тетрагидрофуран (ч.);
калия гидроксид гранулированный;
дезоксиниваленол, аналитический стандарт.

Оборудование: хроматограф жидкостный микроколоночный «Милихром» или аналогичный; мельница МРП-1; делитель БИС-1; испаритель ротационный ИР-1; насос водоструйный; баня песочная с терморегулятором; фильтры бумажные с синей лентой; уголь активированный марки «АГН», техн.; колонка хроматографическая 62 × 2 мм с фазой C_{18} «Nucleceil C_{18}»; колонка для очистки экстрактов [воронка типа ВФ-2, на дно которой закладывается 5—6 кусочков фильтровальной бумаги с толщиной слоя 0,2—0,3 см, затем засыпается слой адсорбента (смесь активированного угля и цеолита 1:1) 1 г и алюминия оксид 4 г]; прибор для перегонки растворителей; колбы стеклянные разные; цилиндры мерные.

Ход определения. 25 г размолотого зерна (муки) помещают в колбу на 250 мл и заливают 125 мл раствора для экстракции (ацетонитрил-вода 5:1 по объему). Колбу встряхивают круговыми движениями и оставляют на 16 ч при комнатной температуре. Экстракт фильтруют в другую колбу через бумажный фильтр с синей лентой. Экстракт чистят на колонке. Для этого 20 мл экстракта порциями пропускают постепенно через колонку. Экстракт собирают, упаривают досуха в вакуум-ротационном испарителе при 50 °С. Сухой остаток растворяют в 1 мл смеси перегнанного тетрагидрофурана и воды, которая используется в качестве подвижной фазы в жидкостной хроматографии. 10 мкл раствора вводят в жид-

костный хроматограф и проводят хроматографирование при скорости подвижной фазы 1,2 мл/мин.

Для количественного определения содержания дезоксиниваленола в образце предварительно строят калибровочный график на стандартном растворе микотоксина. Для этого 20 мкг дезоксиниваленола растворяют в 1 мл подвижной фазы (тетрагидрофуран-вода 1:1 по объему) и последовательно вводят в хроматограф в объеме 1, 2,...,10 мкл, что соответствует количественному содержанию микотоксина 20, 40,...,200 нг. Количество дезоксиниваленола в исследуемом образце определяют по высотам пиков стандартных растворов и анализируемых проб.

Расчет содержания микотоксина в мг/кг исследуемого образца проводят по формулам, приведенным для ГЖХ.

Количественное определение афлатоксинов B_1 и G_1 в кормах. Метод разработан Н. А. Соболевой.

В настоящее время известно четыре основных представителя семейства афлатоксинов (афлатоксины B_1, B_2, G_1 и G_2), однако наибольшее санитарно-токсикологическое значение представляет афлатоксин B_1. Продуценты афлатоксинов грибы Aspergillus flavus, A. parasiticus. Гриб A. flavus широко распространен в России, однако оптимальная температура для образования афлатоксинов 25—30 °С, поэтому это микотоксины тропических стран — Индии, Тайланда, Бразилии и других с оптимальными условиями для их образования (высокая влажность и температура). В наибольшем количестве афлатоксины образуются в арахисовых орехах, зерне кукурузы и некоторых других культурах. Значительная часть арахисового шрота, произведенного во влажных зонах тропических стран, контаминирована афлатоксином B_1.

Афлатоксин B_1 относится к классу высокотоксичных соединений с $ЛД_{50}$ для лабораторных животных 3—5 мг/кг. Особенно чувствительны к нему утки, индейки, форель, кролики. Афлатоксины обладают выраженным гепатотоксическим действием.

Принцип. Метод основан на экстракции токсинов из кормов водным ацетоном, очистке экстрактов от сопутствующих примесей гексаном, переэкстракции токсинов в хлороформ или бензол, их очистке на хроматографической колонке с силикагелем и алюминия оксидом и последующем определении с помощью тонкослойной хроматографии по флуоресценции в УФ-лучах.

Реактивы: ацетон (ч. д. а.);
гексан (х. ч.);
хлороформ для наркоза;
толуол (ч. д. а.);
кислота муравьиная (ч. д. а.);
этилацетат (х. ч.);
натрия хлорид 4 %-ный водный раствор;
метанол (х. ч.);
четыреххлористый углерод (х. ч.);

кислота уксусная (х. ч.);
силикагель КСК;
алюминия оксид;
натрия сульфат безводный;
стандарт афлатоксина B_1 производства ВНИИВСГЭ.

Оборудование: готовые к употреблению пластинки для ТСХ типа «Силуфол», камера для хроматографирования; УФ-лампа с длиной волны 365 нм; весы аналитические АДВ-200; микрошприц на 10 мкл; весы технохимические с точностью до 0,01 г; хроматографическая колонка диаметром 1,6 см, длиной 25 см; шуттель-аппарат; колбы мерные на 25, 50, 100 мл; кофемолка; цилиндры мерные на 100 и 500 мл; делительные воронки.

Ход определения. Измельченную пробу массой 50,0 г помещают в колбу на 500 мл с притертой пробкой, заливают 150 мл смеси ацетон-вода (85 + 15). Колбу закрывают пробкой и встряхивают на шуттель-аппарате в течение 45 мин. Полученный экстракт отфильтровывают через бумажный фильтр в мерный цилиндр на 100 мл, отбирая первые 75 мл фильтрата, которые переносят в делительную воронку на 500 мл. Цилиндр ополаскивают 5 мл ацетона и сливают в ту же делительную воронку. К фильтрату приливают 50 мл гексана, закрывают пробкой и энергично встряхивают 1,5—2 мин. Затем в делительную воронку приливают 150 мл 4%-ного раствора натрия хлорида, аккуратно перемешивают содержимое воронки и дают слоям разделиться. После этого нижний водно-ацетоновый слой сливают во вторую делительную воронку и в ней проводят переэкстракцию токсинов из водного ацетона в бензол или хлороформ.

При использовании хлороформа 25 мл его приливают в делительную воронку, аккуратно перемешивают и дают слоям разделиться. После разделения слоев нижний слой фильтруют в колбу на 250 мл через бумажный фильтр со слоем безводного натрия сульфата. Операцию переэкстракции повторяют еще трижды, каждый раз сливая нижний слой в ту же колбу. После этого промывают фильтр 10 мл хлороформа, полученный объединенный экстракт упаривают на водяной бане до 5 мл и используют для очистки на хроматографической колонке.

При переэкстракции афлатоксинов из водного ацетона в бензол в делительную воронку с экстрактом после обезжиривания гексаном вносят 25—30 мл бензола, встряхивают и после разделения слоев нижний слой отбрасывают, а бензольный экстракт, оставшийся в воронке, сливают в колбу на 100 мл. Делительную воронку промывают 10 мл бензола и сливают в ту же колбу. Объединенный бензольный экстракт упаривают на водяной бане, растворяют в 5 мл хлороформа и используют для очистки на хроматографической колонке.

В нижнюю часть хроматографической колонки помещают ватную пробку, вносят силикагель (высота столбика 1 см) и на сили-

кагель наслаивают алюминия оксид (высота столбика 2,0—2,5 см), на который помещают слой безводного натрия сульфата высотой 3 см. Колонку по мере наполнения обстукивают для лучшего уплотнения сорбентов.

В колонку количественно переносят упаренный до 5 мл экстракт, дают ему впитаться и элюируют токсины 100 мл смеси хлороформ-ацетон (9:1). Из колбы Бунзена элюат количественно переносят в колбу Эрленмейера на 200 мл и упаривают на водяной бане до 4—5 мл. Упаренный экстракт количественно переносят в мерную пробирку на 10 мл и хлороформом доводят объем до метки (основной раствор). Полученный экстракт используют для тонкослойной хроматографии.

Тонкослойная хроматография. На пластинке отмечают линию старта в 1,5—2,0 см от нижнего края пластинки и наносят 20, 5, 2, 1 и 20 мкл из основного раствора (пробы 1, 2, 3, 4 и 5 соответственно). На ту же пластинку в пятно основного раствора пробы вносят 5 мкл стандартного раствора смеси афлатоксинов и рядом наносят на пластинку пробу стандартного раствора афлатоксинов в количестве 5 мкл (концентрация афлатоксинов B_1 и G_1 в стандартном растворе должна быть 1 мкг/мл и по 0,5 мкг/мл для афлатоксинов B_2 и G_2). Пластинку подсушивают на воздухе для удаления растворителя и проводят последовательную хроматографию в двух системах растворителей. Сначала пластинку помещают в камеру, насыщенную парами системы толуол—этилацетат 85%-ная муравьиная кислота (5 : 4 : 1). Когда фронт растворителя поднимется на 10 см над линией старта, пластинку вынимают из камеры, подсушивают на воздухе и помещают в камеру с системой хлороформ-метанол (99 : 1) и разгоняют в том же направлении на расстоянии 13 см от линии старта*. Пластинку просматривают в УФ-лучах (365 нм). Rf афлатоксинов B_1, B_2, G_1 и G_2 равно соответственно 0,34; 0,29; 0,26 и 0,22.

Вместо системы хлороформ—метанол (99 : 1) можно использовать систему четыреххлористый углерод—ацетон—уксусная кислота (20 : 10 : 1). Rf афлатоксинов в этом варианте будет 0,38, 0,35, 0,33 и 0,29 соответственно для B_1, B_2, G_1 и G_2.

Если в пробе 4 отмечается интенсивная флуоресценция, соответствующая по величине Rf и характеру свечения стандарту, делают разведение основного раствора в 50 раз. Для этого 0,1 мл основного раствора переносят в мерную пробирку на 5 мл и доводят объем раствора до метки хлороформом. Из приготовленного раствора на пластинку наносят 10 и 5 мкл (пробы 6 и 7) и проводят последовательную хроматографию, как описано выше. Концентрацию афлатоксинов определяют по таблице 58.

Для более точного определения афлатоксинов в образце готовят разведение основного раствора в 2, 5 и 10 раз или более и из при-

---

* Если необходимо определять только афлатоксин B_1, хроматографию проводят только в системе толуол—этилацетат — 85%-ная муравьиная кислота (5 : 4 : 1).

58. Определение концентрации афлатоксинов

Номер пробы, в которой отмечают флуоресценцию	Концентрация B_1 и G_1 (мкг/кг)
1	10—20
2	> 20
3	> 50
4	> 100
6	> 500
7	> 1000

готовленного раствора наносят на пластинку постепенно увеличивающиеся в объеме пробы. После разгонки пластинки в хроматографических камерах ее проявляют в УФ-лучах, отмечая наименьший объем пробы, дающий на пластинке минимальную флуоресценцию. Концентрацию каждого афлатоксина вычисляют по формуле

$$x = \frac{1{,}2 \cdot 200 \cdot V}{Wn},$$

где x — концентрация афлатоксинов B_1 или G_1, мкг/кг; 1,2 — коэффициент, учитывающий потери определяемых веществ в ходе анализа; 200 — коэффициент пересчета токсина на 1 кг корма с учетом минимально детектируемых количеств афлатоксина на пластинке; V — конечный объем основного раствора с учетом разведений, мл; W — масса навески образца, соответствующего экстракту, вносимого на колонку, г; n — объем пробы, дающий на пластинке минимальную флуоресценцию, мкл.

Клиническое значение. Обнаружение в кормах афлатоксинов в количествах, превышающих 100 мкг/кг, служит основанием для постановки предварительного диагноза на отравление этими микотоксинами, особенно в случаях отравления уток, индеек, кроликов или форели. Однако окончательный диагноз может быть поставлен по результатам анамнестического расследования (содержание в корме арахисового шрота, кукурузы, ввезенных из тропических стран) и результатов патологоанатомического вскрытия (увеличение печени и почек, геморрагии, отечность, множественные кровоизлияния, некротические очаги в печени).

8.7. МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЯ ХЛОРИДА В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ (ПО А. Ф. БАШМУРИНУ, 1968)

Принцип. Метод основан на извлечении натрия хлорида из патологического материала (содержимое желудочно-кишечного тракта, печень) дистиллированной водой, фильтрации экстракта, осаждении поваренной соли серебра нитратом с последующим титрованием из-

бытка серебра в присутствии индикатора — железоаммониевых квасцов.

Реактивы: 0,1 н. раствор серебра нитрата. В колбу на 1000 мл помещают 17,0 г серебра нитрата, добавляют 150—200 мл концентрированной азотной кислоты и доводят объем в колбе до метки дистиллированной водой;

0,1 н. раствор аммония роданида. 7,6 г аммония роданида помещают в колбу на 1000 мл, растворяют в 500 мл дистиллированной воды и доводят объем в колбе до метки водой;

насыщенный водный раствор железоаммонийных квасцов.

Оборудование: весы аналитические; весы технические; колбы вместимостью 100, 200, 1000 мл; колбы конические вместимостью 250 мл; бюретки на 25 мл; пипетки на 25 и 50 мл; стаканы мерные на 500 мл; стеклянные палочки с резиновым наконечником.

Ход определения. В химический стакан на 500 мл вносят 10 г содержимого желудочно-кишечного тракта или измельченной печени, заливают 100 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Стакан оставляют на сутки при комнатной температуре при периодическом перемешивании содержимого. После этого содержимое фильтруют в колбу через бумажный фильтр. Для исследования отбирают 1/10 жидкости (фильтрата), что соответствует 1 г массы отобранного патологического материала. Фильтрат помещают в колбу для титрования. В колбу добавляют 5 мл 0,1 н. раствора серебра нитрата, 5—7 капель насыщенного раствора железоаммонийных квасцов и титруют 0,1 н. раствором аммония роданида до исчезновения слабо-коричневого окрашивания после сильного встряхивания окрашенного раствора.

Расчет количества натрия хлорида проводят по формуле

$$x = \frac{(A - Б) \cdot 0{,}00585 \cdot 100}{H},$$

где x — количество натрия хлорида, %; A — количество серебра нитрата, взятого на титрование, мл; $Б$ — количество аммония роданида, израсходованного на титрование, мл; 0,00585 — постоянный коэффициент для пересчета на натрия хлорид; H —масса навески пробы материала, г; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

Клиническое значение. Обнаружение в содержимом желудочно-кишечного тракта натрия хлорида выше 0,45 % и в печени выше 0,35 % служит основанием для постановки предварительного диагноза на отравление поваренной солью. Окончательный диагноз может быть поставлен по клиническим признакам интоксикации (цианоз слизистых оболочек и конъюнктивы глаза, учащенное мочеиспускание — солевой диурез, жажда, неудержимое стремление вперед, скрежетание зубами и иногда подгибание под себя тазовых конечностей) и патологоанатомической картине (катарально-геморрагическое воспаление слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, отек подкожных тканей в области живота, век и головы; у кур — фиолетово-синяя окраска гребешка).

8.8. КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ (ПО Е. С. КОВАЛЕВОЙ, 1985)

Метод одобрен отделением ветеринарии ВАСХНИЛ, 1985.

Принцип. Метод основан на измерении интенсивности окрашивания комплекса, образующегося при взаимодействии нитрита-иона с амидом сульфаниловой кислоты и N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлоридом. Нитраты определяют путем их восстановления до нитритов с помощью губчатого кадмия, которые устанавливают проведением вышеназванной реакции с последующим пересчетом на нитрат. Предел обнаружения нитритов 0,2 мг/кг, нитратов — 0,4 мг/кг.

Реактивы: натрий азотнокислый;
калия нитрат;
цинк металлический гранулированный;
кадмия сульфат;
кислота хлористоводородная;
трилон Б;
аммиак водный;
калий железисто-синеродистый (желтая кровяная соль);
цинка ацетат;
кислота уксусная, ледяная;
натрия тетраборат (бура);
активированный уголь марки БАУ-А, ОУА;
алюминия сульфат;
амид сульфаниловой кислоты (стрептоцид белый);
N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорид;
0,1 н. раствор кислоты хлористоводородной;

раствор кадмия сульфата. 37 г кадмия сульфата растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 1000 мл и доводят объем в колбе до метки;

буфер аммонийный, pH 9,6—9,7. 20 мл концентрированной кислоты хлористоводородной растворяют в 500 мл дистиллированной воды, перемешивают, добавляют 10 г трилона Б и 55 мл концентрированного аммиака, доводят объем в колбе до метки дистиллированной водой, перемешивают и проверяют pH;

насыщенный раствор буры. 50 г натрия тетрабората помещают в мерную колбу на 1000 мл, добавляют при тщательном перемешивании 500 мл воды и после растворения доводят объем в колбе до метки;

реактив Кареза I. 106 г калия железисто-синеродистого растворяют в колбе на 1000 мл и доводят объем до метки. Хранят не более 1 мес;

реактив Кареза II. 220 г цинка ацетата и 30 мл ледяной уксусной кислоты растворяют дистиллированной водой в мерной

колбе на 1000 мл, доводят объем колбы до метки. Хранят не более 1 мес;

растворы для проведения цветной реакции: а) реактив I. 2 г амида сульфаниловой кислоты растворяют в 400—500 мл водного раствора кислоты хлористоводородной, приготовленной в соотношении 1:1, а затем доводят объем этой кислотой до 1000 мл; б) реактив II. 0,25 г N-(1-нафтил)-этилендиаминдигидрохлорида растворяют в 250 мл дистиллированной воды.

Приготовление губчатого кадмия. Гранулы цинка распределяют по дну кристаллизатора на расстоянии 3—4 мм друг от друга и заливают раствором кадмия сульфата. Через 3—4 ч осадок отделяют от цинка и помещают в стакан с водой, избегая его соприкосновения с воздухом. Затем его измельчают в гомогенизаторе в 0,1 н. растворе кислоты хлористоводородной, отмывая от пылевидных частиц, и хранят под слоем воды. Перед работой кадмий заливают на 1 сут 0,1 н. раствором кислоты хлористоводородной, промывают водой и заполняют им редукционную колонку, наполненную водой. Слой кадмия во время заполнения колонки периодически перемешивают стальной проволокой так, чтобы не оставалось пузырьков воздуха. Скорость потока жидкости через колонку не должна превышать 3 мл/мин.

Перед использованием редукционной колонки ее промывают 25 мл 0,1 н. раствором кислоты хлористоводородной, 50 мл аммонийного буферного раствора, разведенного водой в соотношении 1 : 9. Уровень жидкости в колонке должен быть выше уровня кадмия. Проверяют восстановительную способность колонки, используя стандартный раствор калия нитрата. Процент открытия должен быть не ниже 90, в противном случае кадмий переносят в химический стакан и заливают на 1—2 сут 0,1 н. раствором кислоты хлористоводородной.

Оборудование: ФЭК-56 или другой аналогичный прибор с зеленым светофильтром; редукционная кадмиевая колонка (описание дано в разделе «Реактивы и растворы»); колбы стеклянные различной вместимости; цилиндры мерные.

Ход определения. Для приготовления стандартных растворов 1,465 г калия нитрата растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 5 мл раствора помещают в мерную колбу на 1000 мл и доводят до метки водой. В 1 мл содержится 73,25 мкг калия нитрата. Раствор готовят в день проведения анализа из предварительно просушенного при 105 °С калия нитрата. Для приготовления раствора натрия нитрита 1 г натрия нитрата растворяют в небольшом объеме воды, количественно переносят в мерную колбу на 500 мл, доводят объем до метки и перемешивают. Для приготовления рабочего стандартного раствора 25 мл основного раствора переносят в мерную колбу на 1000 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Для построения градуировочного графика из стандартного рабочего раствора готовят серию разведений. Для этого 2, 5 и 10 мл рабочего раствора переносят в мерные колбы на 100 мл и

доводят до метки водой. Содержание в них натрия нитрата составит соответственно 1,0, 2,5 и 5,0 мкг/мл. Разведения готовят непосредственно перед построением градуировочного графика.

Построение градуировочного графика состоит в следующем. В первую мерную колбу на 100 мл вносят 10 мл воды, в остальные — по 10 мл стандартного раствора каждой концентрации. Затем в каждую колбу вносят по 50 мл дистиллированной воды, добавляют по 10 мл реактива I для проведения цветной реакции и оставляют стоять в темноте в течение 5 мин, после чего добавляют по 2 мл реактива II и снова выдерживают в темноте в течение 5 мин, доводя водой до метки, и перемешивают. В результате реакции образуется раствор красного цвета, интенсивность которого измеряют на ФЭКе с зеленым светофильтром в кювете с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Подготовка пробы. 2—10 г измельченного на гомогенизаторе растительного материала или тщательно размолотого на лабораторной мельнице сухого материала помещают в мерную колбу на 200 мл, заливают 100—150 мл дистиллированной воды, добавляют 5 мл насыщенного раствора буры и выдерживают в течение 1 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая, или ставят на ночь в холодильник при температуре 0—2 °С. Затем в колбу добавляют по 2 мл реактивов Кареза I и II, доводят объем до метки дистиллированной водой, перемешивают, выдерживают в течение 10—15 мин и фильтруют через складчатый фильтр, предварительно промытый дистиллированной водой. При плохой фильтрации пробу можно центрифугировать. Если фильтрат имеет окраску, его дополнительно пропускают через фильтр с молотым активированным углем, предварительно промытым дистиллированной водой. В фильтрате определяют содержание нитратов и нитритов.

При определении нитритов 10—50 мл очищенного фильтрата помещают в колбу на 100 мл, доводят объем дистиллированной водой до 60—65 мл и проводят цветную реакцию, как при построении градуировочного графика, доводят объем дистиллированной водой до метки, перемешивают и колориметрируют по отношению к контрольной пробе.

При определении нитратов 10—50 мл фильтрата пропускают через колонку с губчатым кадмием, заливая в воронку вместе с водой 5 мл аммонийного буферного раствора. Элюат собирают в мерную колбу на 100 мл. Колонку несколько раз промывают дистиллированной водой, которую сливают в эту же колбу до объема 60—65 мл. Доводят объем в колбе до метки, перемешивают, отбирают на цветную реакцию 10—15 мл и далее поступают, как при построении калибровочного графика. Если оптическая плотность окрашенного комплекса превышает максимальные значения оптической плотности градуировочного графика, то цветную реакцию повторяют с меньшими объемами исследуемой воды или фильтрата.

Расчет содержания нитритов (x_1, мг/кг) ведут по формуле

$$x_1 = \frac{C \cdot 200 \cdot 100}{mV},$$

где C — содержание нитритов в 1 мл окрашенного раствора, найденное по градуировочному графику, мкг; m — масса пробы, г; V — объем фильтрата для цветной реакции, мл.

Содержание нитратов (x_2, мг/кг) вычисляют по формуле

$$x_2 = \frac{C \cdot 200 \cdot 100 \cdot 100}{mV_1V_2} \cdot 1{,}465 \text{ или } x_2 = \frac{C \cdot 200 \cdot 100}{V_1 m} \cdot 1{,}465,$$

где V_1 — объем фильтрата, пропущенного через колонку с кадмием, мл; V_2 — объем фильтрата, взятый для цветной реакции, мл; 1,465 — коэффициент пересчета калия нитрита на калия нитрат.

Второй формулой пользуются в случае, если берут весь объем элюата.

Клиническое значение. Обнаружение в кормах нитратов на уровне, превышающем 2000 мг/кг корма, и нитритов выше 100 мг/кг дает основание предполагать, что заболевание и гибель животных связаны с отравлениями нитратами или нитритами. Однако окончательный диагноз можно поставить только после анализа клинических признаков интоксикации (нарушение координации движений, сильно выраженный цианоз слизистых оболочек), исследования крови на метгемоглобин и результатов патологоанатомического вскрытия (кровь окрашена в темно-шоколадный цвет, плохо свертывается, паренхиматозные органы кровенаполнены).

8.9. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЛКАЛОИДОВ

Алкалоиды — группа органических веществ, вырабатываемых различными растениями, которые принято называть ядовитыми (белена, красавка, чемерица и др.), содержащие в своей молекуле азот и обладающие высокой физиологической активностью (аконитин, атропин, лупинин, никотин, анабазин). Некоторые из алкалоидов обладают исключительно высокой токсичностью. Так, смертельная доза аконитина для животных при введении внутрь составляет 0,02—0,05 мг/кг (И. А. Гусынин, 1947). Отмечены случаи отравлений крупного рогатого скота и лошадей при поедании сена с примесью чемерицы, содержащей алкалоиды протовератрин и йервин. Для диагностики отравлений исследуют на алкалоиды растительные корма, с которыми связана интоксикация животных. Для определения в кормах алкалоидов в основном используют реакции осаждения и колориметрии.

Принцип. Метод основан на экстракции алкалоидов из щелочной среды хлороформом и идентификации их посредством специфических реакций с различными реагентами — Эрдмана, Манделина, Вагнера, Драгендорфа, растворами танина, пикриновой, серной и азотной кислот (Сметов с соавт., 1987).

Реактивы: алкалоиды аконитин, атропин, берберин, бруцин, колхицин, кураре, дигитамин, дигитоксин, морфин, никотин, физостиомин, пикротоксин, соланин, стрихнин, вератрин и др.;

аммония ванадат мета (ч. д. а.);

висмута нитрат (ч. д. а.);

йод элементный (ч. д. а.);

калия гидроксид (ос. ч.);

калия йодид (х. ч.);

кислота азотная (х. ч.);

кислота серная (ос. ч.);

кислота хлористоводородная (х. ч.);

кислота пикриновая (ч. д. а.);

3%-ный раствор натрия гидроксида (х. ч.);

реактив I: концентрированная серная кислота;

реактив II: концентрированная азотная кислота;

реактив III (Эрдмана). К 20 мл концентрированной серной кислоты прибавляют азотную кислоту (10 капель кислоты на 100 мл дистиллированной воды);

реактив IV (Манделина). Свежеприготовленный раствор: 0,01 г аммония ванадата в 2 мл концентрированной серной кислоты;

реактив V (Вагнера). 5 г йода в 100 мл 10%-ного раствора калия йодида;

реактив VI: 5%-ный водный раствор танина;

реактив VII: 1%-ный водный раствор пикриновой кислоты;

реактив VIII (Драгендорфа). 8 г висмута нитрата растворяют в 20 мл азотной кислоты, полученный раствор вливают в концентрированный раствор калия йодида (27,2 г соли в 20 мл воды), через сутки фильтруют, объем фильтрата доводят до 100 мл дистиллированной водой;

реактив тимолфталеиновый. В 5 мл дистиллированной воды растворяют 1,5 г калия гидроксида или 1,0 г натрия гидроксида. 0,3 мл приготовленного раствора щелочи смешивают с 14,7 мл свежепрокипяченной дистиллированной воды, берут 0,1 г свежеперекристаллизованного из спирта тимолфталеина и растворяют в 15 мл этанола-ректификата. К полученному раствору тимолфталеина добавляют 5 мл раствора калия или натрия гидроксида. Реактив окрашен в интенсивно-синий цвет. В склянке с притертой пробкой хранят 3 мес;

танин (ч. д. а.);

тимолфталеин (тимолсульфофталеин), индикатор.

Оборудование: весы аналитические и технические; баня водяная; колбы конические различной вместимости и другая посуда и оборудование.

Ход определения. Готовят экстракт для определения алкалоидов (по Габовичу). Пробу массой 1 г тщательно измельчают и переносят в коническую колбу с притертой пробкой на 50 мл, приливают 3 мл 3%-ного раствора натрия гидроксида (для сена — 5 мл,

для муки и комбикорма — 15 мл), энергично встряхивают 1 мин. Приливают 10 мл хлороформа (для сена — 15 мл, для отрубей и муки — 25 мл), закрывают пробкой и еще раз встряхивают 3 мин. После отстаивания хлороформ фильтруют через бумажный фильтр в колбу или фарфоровую чашку, содержащую 5 мл воды, подкисленную двумя каплями кислоты хлористоводородной. Хлороформ отгоняют на водяной бане, водный остаток фильтруют и исследуют на алкалоиды.

Для идентификации алкалоидов в несколько пробирок небольшой вместимости (по числу реактивов и проб) вносят по 1 мл испытуемого подкисленного кислотой хлористоводородной раствора или же наносят по 1—2 капли раствора на часовые стекла. Затем добавляют равные объемы реактивов на алкалоиды и наблюдают за изменением окраски или образованием осадка на темном фоне. В присутствии алкалоидов в испытуемой жидкости появляются помутнение, взвесь. Может образоваться осадок, цвет которого зависит от использованных реактивов. Ставят не менее 3—4 групповых реакций с разными реактивами.

При подкислении раствора, содержащего алкалоиды, серной кислотой и обработке реактивом VIII (Драгендорфа) образуются следующие осадки: акониты (хромово-желтый), атропин (красно-желтый), колхицин, морфин (желто-красный), наркотин, никотин, брucин, физостигмин, стрихнин (светло-желтый, постепенно темнеет), вератрин (светло-желтый, постепенно темнеет и переходит в канарееечно-желтый).

Определение алкалоидов методом ТСХ (по В. М. Серову, В. А. Волковой, 1979). Принцип. Метод основан на извлечении алкалоидов из растительного материала в виде солей или оснований, их качественной идентификации посредством цветных реакций и последующим полуколичественном определении после разделения в тонком слое алюминия оксида.

Метод позволяет определять алкалоиды в количестве 2—50 мг/кг. Относительная ошибка определения около 30 %.

Реактивы: вышеперечисленные алкалоиды и их растворы в хлороформе концентрацией 5 мг/мл;

алюминия оксид для хроматографии II степени активности;

10%-ный раствор 25% (ч. д. а.) аммиака водного;

висмута нитрат основной (ч. д. а.);

динопиловый эфир фталевой кислоты (динопилфталат) для хроматографии (ч. д. а.);

калия йодид (х. ч.);

кислота винная (ч. д. а.);

5 и 10%-ный растворы кислоты серной (ос. ч.);

25%-ный раствор кислоты уксусной (х. ч.);

кислота щавелевая (ч. д. а.);

подвижный растворитель для ТСХ: хлороформ-ацетон-динопилфталат (5 : 4 : 1);

реактив I. Растворяют 16,5 г висмута нитрата в 500 мл 25%-ной уксусной кислоты, отдельно растворяют 80 г калия йодида в 200 мл дистиллированной воды, оба раствора смешивают (1:1) и выдерживают в склянке из темного стекла 1 мес. Для проявления алкалоидов смешивают 20 мл готового раствора с 20 мл ледяной уксусной кислоты и 100 мл воды, предел обнаружения на бумаге — 3—5 мкг алкалоида;

реактив II. В 800 мл дистиллированной воды растворяют 200 г винной кислоты, затем 17 г висмута нитрата. Отдельно растворяют 160 г калия йодида в 400 мл воды. Оба раствора смешивают и хранят в склянке из темного стекла. Для проявления алкалоидов берут 10 мл основного раствора, вносят 50 мл воды и растворяют 10 г винной кислоты. Чувствительность реакции на бумаге — 1—3 мкг алкалоида.

Оборудование: бумага хроматографическая марки «М»; камера для люминесцентного анализа или УФ-осветитель; мельница электрическая МРГ-1; сито 100 мешь.; центрифуга со стаканами вместимостью 100 мл и более и другое оборудование, необходимое для проведения анализа с помощью ТСХ.

Ход определения. Экстракцию проводят двумя способами: извлечение водой в виде солей и в форме оснований органическими растворителями.

При экстракции в виде солей 100 г измельченной пробы кормов заливают водой в соотношении для сочных кормов 1 : 4, для сухих — 1:10. В склянку с материалом при постоянном помешивании добавляют 10%-ный раствор серной кислоты до pH 3. Затем склянку тщательно взбалтывают и ставят в водяную баню при температуре 40 °С на 2 ч при периодическом помешивании. Дальнейшее исследование сочных кормов проводят сразу же после окончания нагревания, сухих объектов — через 24 ч после настаивания.

Водную вытяжку из растений фильтруют через бумажный фильтр в делительную воронку, промывают хлороформом порциями по 30 мл 2 раза путем легкого взбалтывания в течение 5 мин. Хлороформ отделяют и отбрасывают, а к очищенной водной фазе (желательно на холоде) добавляют раствор аммиака до pH 9. Подщелоченную водную вытяжку переносят во вторую делительную воронку и алкалоиды экстрагируют хлороформом 3 раза по 50, 30 и 20 мл путем легкого взбалтывания в течение 5—7 мин. Хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр, предварительно смоченный обезвоженным хлороформом, в выпарительную чашку и упаривают досуха в токе воздуха.

Экстракцию в виде оснований применяют только для сухих кормов и высушенных ядовитых растений. Для этого 100 г измельченной пробы смачивают 10%-ным раствором аммиака до слабого увлажнения, переносят в склянку, плотно закрывают и оставляют на 30 мин. По истечении этого срока массу заливают хлороформом в соотношении 1 : 8 и оставляют при комнатной температуре на

24 ч. Экстракт фильтруют через бумажный фильтр в делительную воронку и трижды реэкстрагируют 5%-ным водным раствором серной кислоты порциями по 50, 30 и 20 мл. Экстракты объединяют, фильтруют через ватный фильтр, вносят 10%-ный раствор аммиака до pH 9 и вновь извлекают хлороформом, промывая порциями по 30 мл. Хлороформные экстракты объединяют, фильтруют через бумажный фильтр в чашку для упаривания и упаривают досуха в токе воздуха.

Для идентификации алкалоидов сухой остаток одной пробы растворяют в 1 мл хлороформа. Часть полученного раствора наносят на хроматографическую бумагу размером 3 × 7 см микропипеткой. Затем реактивом I и II проявляют бумагу с нанесенными на нее пробами. При анализе алкалоидов в хлороформных экстрактах на бумаге появляются красные или малиновые пятна. В случае появления нечетких пятен проявленную бумагу отмывают водой до обесцвечивания фона, при этом на белой поверхности бумаги четко видны пятна алкалоидов красного цвета. В случае получения положительной реакции на алкалоиды их определяют методом ТСХ.

Затем начинают хроматографирование. На старт хроматографической пластинки микропипеткой или микрошприцем наносят 20 мкл хлороформных экстрактов. Для контроля рядом наносят стандартные растворы алкалоидов или же экстракты из отобранных ядовитых растений. Пластинку помещают в камеру для хроматографирования, используя в качестве подвижной фазы смесь хлороформа, ацетона и линопилового эфира фталевой кислоты. Затем пластинку подсушивают и опрыскивают проявляющими реактивами I и II. Алкалоиды проявляются в виде пятен красного или малинового цвета на желтом фоне. Идентификацию алкалоидов, выделенных из кормов, проводят, сравнивая величины Rf пробы и стандартов. Величины Rf некоторых алкалоидов и окраска пятен приведены в таблице 59.

59. Величина Rf и цвет флуоресценции в зависимости от алкалоида

Алкалоид	*Rf*	Цвет флуоресценции пятна
Аконитин	0,61	Нет
Зонгорин	0,51	Светло-желтый
Лаппаконитин	0,52	Голубой
Кондельфин	0,60	Сине-фиолетовый
Талатизин	0,20	Нет
Лупинин	0,13	»
Секуринин	0,72	Желтый
Анабазин	0,22	Нет

Клиническое значение. Обнаружение алкалоидов в кормах дает основание лишь на постановку предварительного диагноза на отравление. Окончательный диагноз может быть поставлен при обнаружении в кормах остатков ядовитых растений — продуцентов данного вида алкалоидов, клиники интоксикации и данных патологоанатомического вскрытия павших животных.

8.10. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИАНИДОВ

К цианогенным растениям относят сорго, суданскую траву, лен обыкновенный, клевер, вику яровую, вику узколистную, бобовник, манник водяной, бухарник шерстистый и некоторые другие. Наибольшее количество цианидов концентрируется в начальной фазе развития растений, поэтому и случаи отравлений возникают при весенних и ранне-летних выпасах животных или же вследствие подкормки скота зеленой массой, полученной из цианогенных растений. Случаи отравления животных были отмечены при скармливании им льняных жмыхов и шротов. Причина отравления животных — образование в их организме синильной кислоты, смертельная доза которой составляет 1 мг/кг массы животного.

При поедании животными цианогенных растений, жмыхов или шротов, содержащих цианогенные соединения, в желудке или рубце под действием ферментов в присутствии воды образуется синильная кислота, которая и действует токсически на организм.

Для диагностики отравлений исследуют содержимое желудка или рубца павших животных на присутствие синильной кислоты не позднее чем через 2—3 ч после их гибели.

Принцип. Метод основан на выделении из пробы синильной кислоты путем отгонки с водяным паром с последующим ее определением пробой с бензидиновой или пикратной бумагой, а также путем титрования 0,1 н. раствором серебра нитрата.

Реактивы: 1%-ный водный раствор пикриновой кислоты;

10%-ный водный раствор натрия гидрокарбоната (х. ч.);

0,25%-ный раствор бензидина (х. ч.);

0,5%-ный раствор меди сульфата (х. ч.);

кислота винная (х. ч.);

1,5%-ный раствор калия гидроксида;

0,1 н. раствор серебра нитрата;

пикратная бумага. Полоски фильтровальной бумаги размером 1,0—5,0 см пропитывают 1%-ным раствором пикриновой кислоты и высушивают при комнатной температуре, после чего смачивают 10%-ным раствором натрия гидрокарбоната и вновь высушивают;

бензидиновая бумага. Полоску фильтровальной бумаги пропитывают свежим 0,25%-ным раствором бензидина в смеси (1:1) с 0,5%-ным раствором меди сульфата.

Оборудование: прибор для отгонки с водяным паром; водяная баня; колбы круглодонные различной вместимости; цилиндры мерные и другая лабораторная посуда.

Ход определения. В круглодонную колбу помещают 100—150 г содержимого желудка, смешивают с дистиллированной водой до консистенции жидкой кашицы, подкисляют 10 %-ным раствором винной кислоты. Колбу ставят на водяную баню и подсоединяют к аппарату для перегонки водяным паром. Перегонку следует вести медленно, регулируя ее нагреванием парообразователя. Отгонку ведут до получения 100 мл дистиллята. Дистиллят исследует пробами с пикратной или бензидиновой бумагой и определяют содержание синильной кислоты путем титрования 0,1 н. раствором серебра нитрата.

Проба с пикратной бумагой. В колбочку на 50 мл помещают 10—15 мл дистиллята, добавляют 2—3 мл 10%-ного раствора винной кислоты и туда же подвешивают пикратную бумагу. Колбочку закрывают пробкой. При наличии синильной кислоты через 10—15 мин пикратная бумага меняет окраску из золотисто-желтой в красно-оранжевую. Аналогично ставят пробу с бензидиновой бумагой. При наличии синильной кислоты бензидиновая бумага синеет.

Количественное определение синильной кислоты. В коническую колбу отбирают 90 мл дистиллята, добавляют 10 мл 1,5%-ного раствора калия гидроксида и быстро титруют 0,1 н. раствором серебра нитрата при интенсивном взбалтывании. Перед концом титрования исчезает молочно-белый и появляется сиреневатый оттенок титруемой жидкости. После появления оттенка раствор серебра нитрата добавляют постепенно по каплям до появления не исчезающего при взбалтывании осадка.

Расчет. Содержание свободной и связанной синильной кислоты вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_1 V \cdot 0{,}318 \cdot 100}{m},$$

где x — содержание свободной и связанной синильной кислоты, %; m_1 — масса серебра нитрата, содержащегося в 1 мл раствора 0,1 н. концентрации, г; V — объем раствора серебра нитрата, пошедшего на титрование, мл; 0,318 — коэффициент пересчета количества серебра нитрата на синильную кислоту; 100 — коэффициент пересчета в проценты; m — масса исследуемой пробы, г.

Клиническое значение. Обнаружение в содержимом желудка или рубца синильной кислоты в количестве 0,02 % и выше дает основание для предварительного диагноза на отравление цианидами. Окончательный диагноз может быть поставлен на осно-

вании анализа анамнестических данных (обнаружение на пастбище цианогенных растений, включение в рацион жмыха или шрота из семян льна), клинических признаков интоксикации (учащенное и затрудненное дыхание, непроизвольное отделение мочи и кала, у свиней и собак рвота), результатов патологоанатомического вскрытия (скопление красноватой жидкости в грудной и брюшной полостях, заполнение бронхов пенистой жидкостью, дряблость печени и отечность почек).

8.11. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ: РТУТИ, КАДМИЯ, СВИНЦА, МЕДИ

В последние годы наиболее широко применяется атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС) для определения микроколичеств многих химических элементов в различных средах, в том числе в патологическом материале, с целью постановки диагноза на отравление животных тяжелыми металлами. Метод ААС отличается высокой специфичностью, точностью и чувствительностью.

В основе метода ААС лежит закон Кирхгофа, согласно которому элемент поглощает излучение той же длины волны, испускаемой полой лампой, катод которой содержит анализируемый элемент. Если в пробе данный элемент содержится, он поглощает эти лучи. Степень поглощения улавливается фотоэлементом, усиливается и передается в виде электрического сигнала на шкалу прибора. В настоящее время созданы приборы для ААС, в которых автоматизированы процессы атомизации пробы, обработки и регистрации величины сигнала, что позволяет с большой точностью определять их содержание в различных пробах.

Атомно-абсорбционный метод определения ртути в тканях животных, мясе и других продуктах животного происхождения (по В. В. Ермакову, 1987). Принцип. Метод основан на окислении содержащейся в образце ртути в двухвалентный ион, восстановлении его в металлическую форму и определении атомно-абсорбционным спектрофотометром.

Реактивы: гидроксиламина гидрохлорид (х. ч.), раствор 15 г/л;
калия перманганат (х. ч.), 50 г/л;
калия надсульфат (х. ч.), 100 г/л;
кислота азотная (х. ч.), 5,6 М/л;
кислота серная (х. ч.,) 9 М/л (18 н.);
кислота хлористоводородная (х. ч.), 0,5 М/л;
олова дихлорид (х. ч.), 100 г/л;
ртути дихлорид или стандарт-титр;
масло силиконовое.

Оборудование: анализатор ртути MAS-50 или другой аналогичный прибор; склянки для определения ртути с аэратором (барбатером) и другое лабораторное оборудование.

Вся стеклянная посуда должна быть вымыта сначала горячей азотной кислотой с водой (1:1), а затем выполоскана водой.

Приготовление основного раствора ртути: 0,1354 г ртути дихлорида переносят в мерную колбу на 1000 мл и доводят объем до метки при постоянном перемешивании раствором кислоты хлористоводородной концентрацией 0,5 М/л. Аналогично готовят раствор из стандарта-титра: вскрывают стандарт-титр, содержащий 0,135 г ртути дихлорида, и количественно переносят в мерную колбу на 1000 мл. При постоянном перемешивании с раствором кислоты хлористоводородной концентрацией 0,5 М/л доводят объем до метки той же кислотой. Полученный раствор содержит 100 мкг ртути в 1 мл. Раствор хранят в склянке с притертой пробкой в защищенном от света месте в течение 3 мес.

Приготовление стандартного раствора ртути: непосредственно перед определением ртути 1 мл основного раствора ртути помещают в мерные колбы на 100 и 200 мл и доводят объем в обеих колбах до метки кислотой хлористоводородной концентрацией 0,5 М/л. Полученные растворы содержат соответственно 1 и 0,5 мкг ртути в 1 мл.

Приготовление раствора калия надсульфата: в мерную колбу на 100 мл вносят 10 г калия надсульфата, приливают 50 мл воды, добавляют 24 мл концентрированной серной кислоты и доводят объем до метки водой.

Ход определения. Пробу массой 0,2—3,0 г (в зависимости от содержания воды) помещают для деструкции в колбу на 250 мл. Для спокойного течения деструкции в жирные пробы рекомендуется добавлять 5—10 мл калия надсульфата.

Деструкцию закрытым способом проводят в специальном аппарате, который состоит из двугорлой колбы, соединенной через шлиф с холодильником, помещенной на водяной бане. В колбу для деструкции добавляют 15—20 мл смеси концентрированных азотной и серной кислот (1:1), немедленно соединяют ее с обратным холодильником и помещают на водяную баню температурой 60—70 °С на 15 мин. Колбу опускают на 5 мин в кипящую водяную баню. Допускается внесение смеси через обратный холодильник. В колбу осторожно добавляют через специальный отвод или обратный холодильник 30 мл воды и оставляют на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Горячий деструктат фильтруют в мерный цилиндр, смывая колбу из-под деструктата и фильтр горячей водой и собирая промывные воды в тот же цилиндр. Жидкость осаждают, объем в цилиндре доводят до 110 мл водой и выливают в склянку для определения ртути. При необходимости деструктат оставляют до 24 ч.

В склянку с деструктатом добавляют при помешивании раствор калия перманганата в количестве, обеспечивающем полное окисление исследуемого образца (от 15 до 20 мл) или примерно 1 г порошка (раствор должен приобрести коричневую окраску), и оставляют пробу на 10—15 мин. Для удаления избытка калия перманга-

ната к пробе добавляют не меньше 5 мл или несколько кристаллов гидроксиламина гидрохлорида (раствор должен стать совершенно прозрачным). Если при анализе образец вспенивается, для гашения пены перед добавлением олова дихлорида в склянку вносят одну каплю силиконового масла. В склянку приливают 5 мл раствора олова дихлорида и сразу вводят барбатер (аэратор). Ртуть, испаряясь, циркулирует по системе аэратора. Количество ее определяют по шкале прибора при длине волны 253,7 нм.

Расчет. Массовую долю ртути вычисляют по формуле

$$x = \frac{m_2 - m_1}{m},$$

где x — массовая доля ртути, мг/кг; m_2 — масса ртути в исследуемой пробе, мкг; m_1 — масса ртути в контрольной пробе, мкг; m — масса образца, г.

Клиническое значение. Обнаружение ртути в почках на уровне 10—15 мг/кг дает основание предполагать, что заболевание или гибель животных связаны с отравлением ртутью или ее соединениями. Окончательный диагноз может быть поставлен по результатам анализа анамнестических данных, клиники интоксикации (нарушение координации движений, синюшность в области ушей, головы, подгрудка, слепота), патологоанатомического исследования (катарально-геморрагический гастроэнтерит, жировая и зернистая дистрофия печени, кровоизлияния под капсулой почек).

Определение свинца в органах и тканях животных посредством ААС (по В. В. Устенко, 1980). Метод утвержден отделением ветеринарии ВАСХНИЛ, 1980.

Принцип. Метод основан на минерализации пробы концентрированными азотной и хлорной кислотами, экстракционном концентрировании свинца дитизоном в хлороформе, последующей реэкстракции его в разбавленную кислоту хлористоводородную и определении содержания элемента методом ААС с электротермической атомизацией.

Реактивы: азотная кислота (о. с. ч.);
хлорная кислота (ч. д. а.);
кислота хлористоводородная (о. с. ч.);
свинец металлический (х. ч.);
лимонная кислота (о. с. ч.);
гидроксиламингидрохлорид (о. с. ч.);
аммиак водный (о. с. ч.);
хлороформ (х. ч.);
дитизон (ч. д. а.);
бумага индикаторная.

Оборудование: весы аналитические лабораторные; плитка электрическая; баня водяная; спектрофотометр атомно-абсорбционный «Перкин-Элмер-603» с электротермическим атомизатором или любой другой подобный прибор, в том числе отечественного производства; колбы мерные на 25—100 мл; воронки делительные

на 50—200 мл; пипетки на 1—10 мл; микропипетки типа ПЛО 1—20.

Очистка дитизона. Растворяют 1 г дитизона в делительной воронке в 100 мл хлороформа. Добавляют 50 мл аммиака (3%-ного по объему) и встряхивают воронку в течение 3 мин. Дитизон переходит в водный слой. После разделения жидкостей нижний органический слой отбрасывают. К аммиачному экстракту, содержащему дитизон, постепенно добавляют разбавленную (1:1) кислоту хлористоводородную, пока дитизон не выпадет в виде темных хлопьев. Далее извлекают дитизон в 100 мл хлороформа при встряхивании воронки в течение 3 мин. Хлороформный слой отделяют и переносят в чашку для выпаривания. Хлороформ выпаривают на водяной бане путем медленного нагревания при 50 °С.

Для приготовления 0,5%-ного раствора дитизона 0,5 г препарата переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки хлороформом. Раствор хранят в темноте при 5—7 °С.

Все водные растворы готовят на бидистиллированной воде.

Для приготовления 20%-ного раствора лимонной кислоты 20 г реактива растворяют в мерной колбе на 100 мл и доводят объем до метки. Для получения 5%-ного раствора гидроксиламингидрохлорида 5 г реактива растворяют в мерной колбе на 100 мл в воде и доводят объем до метки. Готовят 1,0 и 0,1 н. растворы кислоты хлористоводородной путем разбавления соответственно 83 мл и 8,3 мл концентрированной 37%-ной кислоты в 1 л воды.

Основной раствор свинца концентрацией 1000 мг/л готовят путем растворения 1 г металлического свинца в 10 мл разбавленной (1:1) азотной кислоты при нагревании, после чего объем доводят до 1 л 0,1 н. кислотой хлористоводородной.

Стандартный раствор свинца концентрацией 0,1 мг/л готовят непосредственно перед проведением анализа. Для этого 1 мл основного раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят объем до метки разбавленной (1:100) азотной кислотой. В мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл приготовленного раствора концентрацией 10 мг/л и доводят объем до метки азотной кислотой той же концентрации. Для построения градуировочного графика готовят растворы с известным содержанием свинца. В стаканы вносят различные количества стандартного раствора концентрацией 0,1 мг/л и разбавленной азотной кислоты (табл. 60).

60. Приготовление растворов для градуировочного графика

Компоненты градуировочных растворов и их объем	№ градуировочных растворов					
	1	2	3	4	5	6
Стандартный раствор (0,1 мг/л), мл	—	0,25	0,5	2,5	5,0	10
Кислота азотная (1:100), мл	10	9,75	9,5	7,5	5,0	—
Содержание свинца в пробе, мг/л (мг/кг)	0	0,005	0,01	0,05	0,1	0,2

Ход определения. В химический стакан помещают 5 г исследуемого материала, добавляют 15 мл концентрированной азотной кислоты и выдерживают 30 мин при комнатной температуре. Затем медленно нагревают на электроплитке до образования пены и кипятят до тех пор, пока не снизится выделение бурых паров окислов азота. Стакан снимают с плитки и охлаждают. Приливают по 15 мл концентрированных азотной и хлорной кислот и кипятят до образования белых паров хлорной кислоты. Остаток этой кислоты выпаривают. Минеральный остаток растворяют в 5 мл 1 н. кислоты хлористоводородной и количественно переносят в мерную колбу на 25 мл, доводя объем в колбе до метки бидистиллированной водой. Из мерной колбы пробу переносят в делительную воронку на 100 мл, добавляют 2 мл 20%-ного раствора лимонной кислоты, 2 мл 5%-ного раствора гидроксиламингидрохлорида и доводят pH до 8—9 концентрированным раствором аммиака, контролируя величину его по индикаторной бумаге. Затем приливают 5 мл 0,5%-ного раствора дитизона в хлороформе и экстрагируют свинец при интенсивном встряхивании делительной воронки в течение 2 мин. После разделения фаз органическую фазу переносят в другую делительную воронку на 50 мл, а из водной экстракцию повторяют следующими 5 мл раствора дитизона. Экстракты объединяют в делительной воронке на 50 мл, прибавляют 5 мл 0,1 н. кислоты хлористоводородной и реэкстрагируют свинец встряхиванием в течение 2 мин. Органический слой отделяют, а водный слой промывают двумя порциями хлороформа по 0,5 мл.

ААС проводят при следующих условиях: резонансная длина волны 283,3 нм, ток лампы с полым катодом 10 мА, спектральная полоса пропускания монохроматора 0,7 нм. Режим работы электротермического атомизатора: высушивание — 100 °С (30 с), озоление — 500 °С (30 с), атомизация — 2100 °С (5 с). Расход аргона на стадии атомизации 25 мл/мин. Объем вводимой в атомизатор пробы 20 мкл.

Расчет. Содержание свинца в исследуемом материале вычисляют по формуле

$$x = \frac{C \cdot 5}{P},$$

где x — содержание свинца, мг/кг; C — концентрация свинца в анализируемом растворе, мг/л; 5 — коэффициент; P — масса навески пробы, г.

Клиническое значение. Обнаружение в почках и печени подозреваемых в отравлении животных свинца в количестве 10 мг/кг и выше дает основание для постановки предварительного диагноза на свинцовую интоксикацию. Окончательный диагноз может быть поставлен по результатам анализа анамнестических данных (использование для окраски животноводческих помещений свинцовых белил, попадание в места выпаса животных пластин списанных свинцовых аккумуляторов и др.), клинических признаков интокс-

сикации (судороги, скрежет зубами, слюнотечение, затрудненное дыхание, потеря зрения), характера патологоанатомических изменений (гастроэнтерит с некрозом отдельных участков слизистой оболочки, дистрофические изменения в печени и почках).

Источник литературы

1. **Башмурин А. Ф.** Руководство по токсикологическому анализу в ветеринарии. — М.: Колос, 1968.
2. **Временные** методические указания по определению синтетических пиретроидов (амбуш, децис, рипкорд, сумицидин) методами газожидкостной и тонкослойной хроматографии в растениях, почве, воде водоемов. — М.: Минздрав СССР, 1981.
3. **Временная** методика определения Т-2-токсина в кормах с применением иммуноферментного анализа. — М.: Департамент ветеринарии Минсельхозпрода России, 1996.
4. **Ермаков В. В., Кроль М. Ю., Устенко В. В.** Методы определения тяжелых металлов: ртути, кадмия, свинца, меди / В кн.: Справочник—санитария кормов. — М.: Агропромиздат, 1991.
5. **Клисенко М. А.** Методы определения микроколичеств пестицидов в продуктах питания, кормах, внешней среде. — М.: Колос, 1983.
6. **Методы** определения нитратов и нитритов. — М.: Отделение ветеринарии ВАСХНИЛ, 1986.
7. **Методика** определения дезоксиниваленола в зерне с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. — М.: Отделение ветеринарной медицины РАСХН, 1995.
8. **Методические** указания по санитарно-микологической оценке и улучшению качества кормов. — М.: ГУВ Госагропрома СССР, 1986.
9. **Николаев А. В.** Теория и практика химико-токсикологического анализа в ветеринарии. — М.: Колос, 1968.
10. **Серов В. М., Волкова В. А.** Методы определения алкалоидов / В кн.: Справочник — санитария кормов. — М.: Агропромиздат, 1991.
11. **Талалов Г. А., Хмелевский Б. Н.** Справочник—санитария кормов. — М.: Агропромиздат, 1991.

ГЛАВА 9

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ

9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИЙОДТИРОНИНА (T_3) В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. Метод основан на ферментном иммуноанализе, в основе которого лежит конкуренция немеченных и меченных ферментом антигенов за определенное число антигенсвязывающих участков антител. Количество фермент-меченых антигенов, связавшихся с антителами, обратно пропорционально концентрации немеченых антигенов исследуемого образца. Показатель абсорбции обратно пропорционален количеству трийодтиронина в пробе.

Реактивы: 96 полистириновых микротитрационных ячеек (плашка), внутренние стенки которых покрыты сывороткой с антителами овцы к T_3;

стандарты трийодтиронина — 6 флаконов по 1,0 мл в каждом, обозначенные A—F, содержащие концентрации T_3 соответственно 0 нг/дл, 50, 100, 250, 500 и 750 нг/дл в бычьей альбумин-стабилизированной основе;

T_3-контроли — 2 флакона по 0,5 мл. Уровни I и II, содержащие высокую и низкую концентрации T_3 в бычьей альбумин-стабилизированной основе с нертутным консервантом;

T_3-энзимный конъюгатный концентрат — 1 флакон (1,0 мл), содержащий конъюгат трийодтиронинпероксидазы хрена в бычьей альбумин-стабилизирующей основе; содержит консервант;

буфер для приготовления конъюгата T_3-энзим (красный) — 1 флакон (11 мл) содержит буфер с консервантом и связанные с протеином ингибиторы;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит тетраметилбензидин (ТМБ) в цитратном буфере с пероксидом водорода;

концентрат моющего раствора — 1 флакон (105 мл) содержит поверхностно-активные вещества в фосфатно-солевом буферном растворе и консервант;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты.

Примечание. Образцы крови помещают в воду со льдом и немедленно доставляют в лабораторию, где быстро отделяют сыворотку или плазму эритроцитов. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и тща-

тельно перемешать. Сыворотку (плазму) крови хранить не более 48 ч в холодильнике при 2—8 °С. Для более длительного хранения исследуемые образцы замораживают и хранят при −20 °С и ниже. Не рекомендуется исследовать гемолизированные и липемичные образцы. Образцы сыворотки (плазмы) крови, стандарты и контроли рекомендуется исследовать в дублях.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, настраиваемый на длину волны 450 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) Stat Fax-2200, настраиваемый на 500—700 движений в 1 мин; автоматическое промывающее устройство Stat Fax-2600; полуавтоматические дозаторы объемом 5—50, 50—200 и 200—1000 мкл, наконечники; градуированная лабораторная посуда, полистириновые пробирки; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; бидистиллированная вода; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Рабочий раствор T_3-энзимного конъюгатного концентрата: в чистой посуде развести T_3-энзимный конъюгатный концентрат (1,0 мл) буфером для приготовления конъюгата (1:11). Например, для 16 ячеек необходимо 160 мкл (0,16 мл) конъюгата растворить в 1,6 мл буфера (раствор готовят с небольшим запасом и используют в течение 24 час).

2. Моющий раствор: 100 мл концентрата моющего раствора в колбе растворить в 900 мл бидистиллированной воды.

3. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов с ячейками. Остальные стрипы поместить в защитный влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. В используемые ячейки микротитрационных стрипов пипеткой вносят по 50 мкл стандартов, контролей, исследуемой сыворотки крови. В каждую ячейку добавляют по 100 мкл свежеприготовленного рабочего раствора T_3-энзимного конъюгатного концентрата. Планшку осторожно встряхивают в течение 20—30 с, затем накрывают ее фольгой и инкубируют 60 мин при комнатной температуре (≈25 °С). Промывают ячейки 3 раза, добавляя по 300 мкл моющего раствора. В каждую ячейку вносят по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора. Ставят планшку в темное место и инкубируют в течение 15 мин при комнатной температуре (≈25 °С). Добавляют по 50 мкл стоп-раствора в каждую ячейку и осторожно перемешивают 15—20 с.

Измеряют оптическую плотность растворов каждой ячейки с помощью иммуноферментного планшечного анализатора при длине волны 450 нм. Результаты учитывают в течение 30 мин после добавления стоп-раствора. При возможности для более точного измерения абсорбции необходимо установить прибор на измерение

двойного излучения при длине волны 450 нм с последующей перенастройкой на 600 или 620 нм.

Полученные значения стандартов T_3 используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию трийодтиронина в исследуемых образцах. Стандартная кривая должна быть включена в каждое исследование.

При работе микропланшетного иммуноферментного анализатора с персональным компьютером и наличии соответствующего программного обеспечения стандартная кривая и результаты исследования проб сыворотки (плазмы) крови высчитываются автоматически.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРОКСИНА (T_4) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. Метод основан на ферментном иммуноанализе, в основе которого лежит конкуренция немеченных и меченных ферментом антигенов за определенное количество антигенсвязывающих участков антител. Количество фермент-меченых антигенов, связавшихся с антителами, обратно пропорционально концентрации немеченых антигенов исследуемого образца. Показатель абсорбции обратно пропорционален количеству тироксина в пробе.

Реактивы: 96 микротитрационных ячеек (12 стрипов), внутренние стенки которых покрыты козьими антителами к мышиным γ-глобулинам;

T_4-стандарты — 1 флакон (1,0 мл), маркированный А, содержит 0 мкг/дл тироксина и 5 флаконов (по 0,5 мл), маркированные B—F, содержат концентрации соответственно 0,5, 1,5, 5,0, 15,0 и 50,0 мкг/дл T_4 в человеческой сыворотке с нертутным консервантом;

T_4-контроли — 2 флакона по 0,5 мл каждый. Уровни I и II содержат высокую и низкую концентрации T_4 в человеческой сыворотке с нертутным консервантом;

T_4-энзимный конъюгатный концентрат — 1 флакон из темного стекла (0,3 мл) содержит T_4, конъюгированный с пероксидазой хрена в буфере с нертутным консервантом. Растворяют реагент непосредственно перед использованием;

антитела к T_4 — 1 флакон (11 мл) содержит мышиные моноклональные антитела к T_4 в буфере с нертутным консервантом;

буфер для приготовления конъюгата T_4-фермент — 1 флакон (11 мл) содержит белковый буфер с нертутным консервантом;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон из темного стекла (11 мл), содержащий тетраметилбензидин (ТМБ) в цитратном буфере с водорода оксидом;

концентрат моющего раствора — 1 флакон (105 мл) содержит поверхностно-активные вещества в фосфатно-солевом буферном растворе и консервант. Перед использованием развести в 10 частях дистиллированной воды;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и, осторожно вращая, тщательно перемешать. Пониженная температура реагентов и проб дает заниженные результаты оптической плотности. Сыворотку крови можно хранить при 2—8 °С до 7 дней или более длительное время при минус 20 °С. Следует избегать повторного замораживания и размораживания образцов. Не следует использовать образцы с выраженными признаками гемолиза и липемии.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, настраиваемый на длину волны 450, 600 или 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) Stat Fax-2200, настраиваемый на 500—600 движений в 1 мин; автоматическое промывающее устройство Stat Fax-2600; полуавтоматические дозаторы объемом 5—50, 50—200 и 200—1000 мкл, наконечники; градуированная лабораторная посуда, полистириновые пробирки; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Рабочий раствор T_4-энзимного конъюгатного концентрата: в чистой посуде развести T_4-энзимный конъюгатный концентрат (1,0 мл) буфером для приготовления конъюгата (1 : 50). Например, для 96 ячеек необходимо растворить 220 мкл концентрата конъюгата в 11 мл буфера для приготовления конъюгата T_4-энзим (раствор готовят непосредственно перед применением; неиспользованный раствор конъюгата выливают).

2. Моющий раствор: 100 мл концентрата моющего раствора в колбе растворить в 900 мл бидистиллированной воды.

3. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов с ячейками. Остальные стрипы поместить в защитный влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. Перед использованием все реагенты и пробы должны быть приведены к комнатной температуре (≈25 °С) и тщательно перемешаны. Образцы сыворотки крови, стандарты и контроли рекомендуется исследовать в дублях.

В используемые ячейки микропланшета дозатором вносят по 25 мкл стандартов, контролей и сыворотки крови. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл свежеприготовленного T_4-энзимного конъюгатного раствора (1). Осторожно встряхивают штатив с ячейками 5—10 с, перемешивая содержимое ячеек. Дозатором (лучше многоканальным) вносят в каждую ячейку по 100 мкл бу-

ферного раствора с антителами к тироксину. Микротитрационную плашку со стрипами помещают в инкубатор-шейкер для инкубации (t ≈ 25 °С) в течение 60 мин, одновременно встряхивая со скоростью 500—600 движений в 1 мин. Используя автоматическое моющее устройство, пятикратно аспирируют и тщательно промывают каждую ячейку моющим раствором (по 350 мкл). Удаляют остатки жидкости с ячеек, переворачивая плашку на фильтровальную бумагу. В каждую ячейку дозатором добавляют по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора. Закрывают микропланшет и инкубируют ячейки в шейкере (встряхивание с частотой 500—600 движений/мин) при *t* ≈ 25 °С на протяжении 10 мин. В каждую ячейку дозатором добавляют по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты) для остановки реакции.

Проводят измерение оптической плотности раствора в ячейках при длине волны 450 нм (в течение 30 мин после добавления стоп-раствора).

Полученные значения стандартов T_4 используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию тироксина в исследуемых образцах.

Примечание. Для перевода мкг/дл в нмоль/л необходимо мкг/дл · 12,9 = нмоль/л.

Клиническое значение. Тиреоидные гормоны (T_3 и T_4) синтезируются в фолликулярных клетках щитовидной железы путем присоединения йода к остаткам молекул аминокислоты тирозина, входящих в состав белка — тиреоглобулина (ТГ), который представляет собой крупный растворимый гликопротеин с молекулярной массой 660 кД. Ежедневная секреция щитовидной железой T_4 составляет 80—100 мкг, а T_3 — около 5 мкг.

При необходимости под влиянием протеазы и пептидазы лизосом фолликулярных клеток ТГ расщепляется, T_3 и T_4 секретируются в кровь, где они связываются с белками плазмы. T_4 обладает высоким сродством к глобулину (тиронинсвязывающий глобулин — ТСГ), меньшим — к преальбумину и в небольших количествах связывается с альбумином (соответственно 75 % с ТСГ и 15—20 % — с пре- и альбумином). Лишь 0,05 % T_4 остается в свободном (несвязанном) состоянии. T_3 связывается практически только с ТСГ, а относительное количество его свободной фракции составляет 0,5 %. T_4 дольше сохраняется в крови — биологический период полужизни его составляет 7—9 дней, а T_3 — 2 дня. Связанные и свободные формы гормонов находятся в динамическом равновесии. Свободные йодтиронины относительно легко проникают сквозь мембрану клеток, влияя на все виды обмена веществ.

Около 85 % циркулирующего в крови T_4 дейодируется в печени и почках с образованием почти 80 % суточного количества T_3.

Содержание общего T_4 у коров колеблется в пределах 50—100 нмоль/л (В. В. Сахнюк, 2003), T_3 — 1,5—2,5, у телят старше 10-дневного возраста соответственно 50—150 и 2,0—3,5 нмоль/л. При

клинически выраженном гипертиреозе содержание T_3 и T_4 повышено, а при гипотиреозе — снижено (у коров содержание T_3 составляет 0,23—1,9 нмоль/л, T_4 — 14,0—52 нмоль/л (В. П. Фасоля, 1996; В. Л. Романюк, 2000). В большинстве случаев уровень T_3 коррелирует с содержанием T_4. У телят с врожденным зобом выявлена гиперфункция щитовидной железы. Прежде всего увеличивается содержание T_3 (В. Л. Романюк, 2002).

Функция щитовидной железы изменяется при некоторых болезнях внутренних органов: уменьшение содержания ее гормонов установлено при бронхопневмонии телят, остеодистрофии, кетозе и гепатодистрофии коров, т. е. развивается так называемый феномен «нормальной больной щитовидной железы».

В настоящее время наблюдается тенденция к определению свободного T_4 у людей как одного из основных маркеров функционального состояния щитовидной железы. В ветеринарии этот тест не нашел еще своего места.

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИРЕОТРОПИНА (ТТГ) В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (DYAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

П р и н ц и п. Определение тиреотропина основано на энзимсвязанном одношаговом сендвичеподобном иммуноанализе. Стандарты, контроли и исследуемые образцы сыворотки крови инкубируют в микротитрационных ячейках, покрытых антит-чТТГ-антителами с другими антит-чТТГ-антителами, меченными энзимами пероксидазы хрена (ПХ). После промывания ячейки инкубируют с субстратом тетраметилбензидина (ТМБ), добавляют кислотный стоп-раствор и определяют степень энзимного оборота субстрата путем измерения абсорбции при двойном излучении на длине волны 450 и 620 нм. Показатели абсорбции исследуемых образцов прямо пропорциональны концентрации ТТГ в пробе.

Реактивы: 96 полистириновых микротитрационных ячеек, покрытых анти-чТТГ-антителами;

ТТГ-стандарты — 1 флакон (А, 1 мл) содержит 0 мкМЕ/мл, 5 флаконов по 0,5 мл (В—F) с концентрациями 0,15, 0,70, 2,00, 7,50 и 22,00 мкМЕ/мл ТТГ в сыворотке свиньи с нертутным консервантом;

ТТГ-контроли — 2 флакона по 0,5 мл каждый. Уровни I и II содержат высокую и низкую концентрации ТТГ в сыворотке свиньи с нертутным консервантом;

аналитический буфер В — 1 флакон (11 мл) содержит протеиновый буфер с нертутным консервантом;

ТТГ-антител-энзимный конъюгатный концентрат — 1 флакон из темного стекла (0,3 мл) содержит анти-чТТГ-антитела, конъюгированные с энзимами пероксидазы хрена в протеиновом буфере с нертутным консервантом (перед использованием необходимое

количество концентрата в зависимости от количества исследуемых образцов растворяют в конъюгатном растворителе;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит тетраметилбензидин в цитратном буфере с пероксидом водорода;

моющий концентрат — 1 флакон (100 мл) содержит буферный солевой раствор с неионным детергентом. Перед использованием разводят в 10 частях деионизированной или бидистиллированной воды;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и, осторожно вращая, тщательно перемешать. Сыворотку крови хранят не более 24 ч в холодильнике при 2—8 °С. Для более длительного хранения исследуемые образцы замораживают и хранят при минус 20 °С и ниже. Не рекомендуется исследовать гемолизированные и липемичные образцы. Пробирку с кровью после взятия пробы тотчас помещают в воду со льдом и немедленно доставляют в лабораторию или отделяют сыворотку или плазму, или замораживают и в замороженном виде доставляют в лабораторию. Антикоагулянт — гепарин, а не ЭДТА.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, настраиваемый на длину волны 450 нм и перенастраиваемый на 600 и 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) Stat Fax-2200, настраиваемый на 500—700 движений/мин; автоматическое промывающее устройство Stat Fax-2600; полуавтоматические пипетки на 50 и 100 мкл, наконечники; градуированная лабораторная посуда, полистириновые пробирки; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Антител-энзимный конъюгатный раствор: антител-энзимный конъюгатный концентрат развести в аналитическом буфере (1 : 50), исходя из числа используемых ячеек (при использовании плашки на 96 ячеек 220 мкл конъюгатного концентрата разводят в 11 мл аналитического буфера). Разводят его непосредственно перед исследованием.

2. Моющий раствор: 100 мл моющего концентрата растворить в 900 мл бидистиллированной воды. Раствор стабилен при комнатной температуре в посуде из темного стекла в течение 1 мес.

3. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов, а остальные стрипы поместить в защитный влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. Перед использованием все реагенты и пробы должны быть приведены к комнатной температуре (≈ 25 °С).

Образцы сыворотки крови, стандарты и контроли необходимо исследовать в параллельных пробах.

В используемые ячейки микротитрационных стрипов пипеткой вносят по 50 мкл стандартов, контролей и исследуемой сыворотки крови. В каждую ячейку добавляют по 100 мкл свежеприготовленного антител-энзимного конъюгатного раствора. Микротитрационную плашку со стрипами помещают в инкубатор-шейкер для инкубации ($t \approx 25$ °С) в течение 90 мин, одновременно встряхивая со скоростью 500—600 движений в 1 мин. Используя автоматическое моющее устройство, пятикратно аспирируют и тщательно промывают каждую ячейку моющим раствором по 350 мкл, используя программу № 3 вошера. После этого удаляют остатки жидкости с ячеек, переворачивая плашку на фильтровальную бумагу. Полуавтоматической пипеткой (лучше использовать 8-канальную) в каждую ячейку добавляют по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора и инкубируют ячейки при комнатной температуре (≈ 25 °С) в течение 10 мин, одновременно встряхивая в инкубаторе-шейкере со скоростью 500—600 движений в 1 мин.

По окончании инкубации в каждую ячейку пипеткой добавляют по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты) для прерывания реакции и развития окрашивания. Помещают плашку со стрипами в иммуноферментный анализатор (ридер) для измерения абсорбции раствора в ячейках при длине волны 450 нм (в течение 30 мин после добавления стоп-раствора). Перед учетом абсорбции микротитрационных ячеек необходимо установить прибор на «0» в соответствии с нулевым стандартом (Blanc). При возможности для более точного измерения абсорбции необходимо установить прибор на измерение двойного излучения при длине волны 450 нм с последующей перенастройкой на 600 или 620 нм.

Полученные значения стандартов ТТГ используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию тиреотропина в исследуемых образцах.

Примечание. Все стандартные растворы приведены в мкМЕ/мл. Для перевода в мМЕ/л необходимо мкМЕ/мл × × 1,0 = мМЕ/л.

Клиническое значение. ТТГ секретируется аденогипофизом. Он стимулирует поглощение щитовидной железой йодида из крови, усиливает синтез тиреоглобулина и его распад с высвобождением T_3 и T_4 в кровь. Секреция тиреоидных гормонов после выделения ТТГ возрастает уже через несколько минут. Уровень ТТГ в крови менее 5 мМЕ/л (1—4 нг/мл, или 0,6—3,8 мкг/л) на протяжении суток не меняется, и поэтому даже разовое определение его дает полезную клиническую информацию. Продукция гипофизарного ТТГ, в свою очередь, находится под контролем гипоталамических гормонов — стимулирующего тиреотропин-рилизинг гормона (ТРГ) и ингибирующего соматостатина.

ТТГ является маркером при оценке функционального состояния щитовидной железы. В основе регуляции секреции ТТГ лежит механизм обратной связи: высокие концентрации T_3 и T_4 ингибируют, а низкие стимулируют секрецию ТТГ.

При гипертиреозе синтез и секреция ТТГ в гипофизе по принципу обратной связи блокированы высокими уровнями T_3 и T_4: количество ТТГ в крови менее 0,2 мИЕ/мл или гормон в крови не определяются. Введение T_3 быстро снижает концентрацию ТТГ. Аналогичное действие оказывает и T_4, но для этого требуется доза в 10 раз больше, чем T_3, а торможение длится в 10 раз дольше.

9.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОРТИЗОЛА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. Метод основан на конкуренции между немеченым антигеном и энзим-меченым антигеном на определенное количество связей с антителом. Количество энзим-меченых антигенов, связанных с антителами, обратно пропорционально концентрации немеченого исследуемого.

Реактивы: 96 микротитрационных ячеек (12 стрипов), внутренние стенки которых покрыты козьей антикроличьей глобулиновой сывороткой;

кортизол-антисыворотка (голубая) — 1 флакон (11 мл) содержит кроличью антикортизоловую сыворотку в протеиновом (BSA) буфере с нертутным консервантом;

кортизол-стандарты — 1 флакон (0,5 мл), обозначенный А, содержит 0 мкг/дл кортизола; 7 флаконов (по 0,5 мл каждый), обозначенные В—Н, содержат кортизол в протеиновом буфере (BSA) с нертутным консервантом в концентрациях 0,5, 1,5, 4,0, 10,0, 20,0, 40,0 и 60 мкг/дл;

кортизол-контроли — 2 флакона (по 0,5 мл каждый) с уровнями I и II содержат кортизол низкой и высокой концентрации в протеиновом буфере сыворотки с нертутным консервантом;

кортизол-энзимный конъюгатный концентрат — 1 ампула (0,3 мл) содержит раствор кортизола в протеиновом буфере с нертутным консервантом. Перед исследованием разводят конъюгатным растворителем;

конъюгатный растворитель — 1 флакон (11 мл) содержит основанный на протеине буфер с нертутным консервантом;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит раствор тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратном буфере с водорода пероксидом;

моющий концентрат — 1 флакон (100 мл) содержит буферные соли с неионным детергентом. Перед использованием разводят в 10 объемах деионизированной или бидистиллированной воды;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед началом анализа должны быть приведены к комнатной температуре (25 °С) и тщательно перемешаны. Пониженная температура реагентов и проб дает заниженные результаты оптической плотности. Сыворотку (плазму) крови, свободную от гемолиза, можно хранить при 2—8 °С 24 ч или более длительное время при минус 20 °С.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, настраиваемый на длину волны 450 нм и 600 или 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) Stat Fax-2200, настраиваемый на 500—700 движений в 1 мин; автоматическое промывающее устройство Stat Fax-2600; полуавтоматические дозаторы на 5—50, 50—200 и 200—1000 мкл, наконечники; градуированная лабораторная посуда; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Энзимный конъюгатный раствор: кортизол-энзимный конъюгатный концентрат развести в чистой посуде конъюгатным растворителем в соотношении 1:50 соответственно количеству используемых ячеек. Если используется вся плашка, необходимо отмерить точно 200 мкл кортизол-энзимного конъюгатного концентрата и 10 мл конъюгатного растворителя. Готовят непосредственно перед использованием.

2. Моющий раствор: 100 мл концентрата моющего раствора в колбе растворить в 900 мл бидистиллированной воды.

3. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов с ячейками. Остальные стрипы поместить в защитный влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. В используемые ячейки микропланшета дозатором вносят по 25 мкл стандартов, контролей и сыворотки крови. Добавляют по 100 мкл свежеприготовленного энзимного конъюгатного раствора. Осторожно встряхивают штатив с ячейками 5—10 с, перемешивая содержимое ячеек. Дозатором (лучше многоканальным) вносят в каждую ячейку по 100 мкл кортизол-антисыворотки. Микротитрационную плашку со стрипами помещают в инкубатор-шейкер для инкубации (≈ 25 °С) в течение 45 мин, одновременно встряхивая со скоростью 500—700 встряхиваний в 1 мин. Используя автоматическое моющее устройство, аспирируют и пятикратно тщательно промывают каждую ячейку моющим раствором по 350 мкл, избегая попадания пузырьков воздуха. После этого удаляют остатки жидкости с ячеек, переворачивая плашку на фильтровальную бумагу. В каждую ячейку дозатором добавляют по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора. Закрывают микропла-

шет и инкубируют ячейки в шейкере (встряхивание с частотой 500—700 движений в 1мин) при $t \approx 25$ °С 10—15 мин. В каждую ячейку дозатором добавляют по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты). Встряхивают плашку 5—10 с.

Измеряют оптическую плотность раствора в ячейках при длине волны 450 и 620 нм (в течение 30 мин после добавления стоп-раствора).

Перед считыванием абсорбции необходимо установить прибор на «0» соответственно с нулевым стандартом (Blank).

Полученные значения стандартов кортизола используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию гормона в исследуемых образцах. Пробы, значения которых превышают наивысший стандарт, необходимо дополнительно развести стандартом 0 мкг/дл и повторно исследовать.

Примечание. Все стандарты приведены в мкг/дл. Для перевода в нмоль/л необходимо мкг/дл · 27,6 = нмоль/л.

Клиническое значение. Кортизол вырабатывается корой надпочечников из холестерола. Стимулируется секреция кортизола адренокортикотропным гормоном гипофиза (АКТГ), выделение которого, в свою очередь, активируется гипоталамическим кортикотропным рилизинг-гормоном (КРГ, кортиколиберином). Секреция кортиколиберина контролируется соответствующими центрами головного мозга. Около 90 % циркулирующего в крови кортизола находится в связанном с глобулином состоянии, остальное количество — в свободном.

Кортизол усиливает синтез белка, в печени стимулирует синтез глюкозы из неуглеводистых источников, прежде всего — из аминокислот (*глюконеогенез*).

При первичной недостаточности коры надпочечников уменьшается синтез глюко- и минералокортикоидов (кортизола и альдостерона), *при вторичной*, обусловленной снижением секреции АКТГ, — глюкокортикоидов. Гипоадренокортицизм чаще встречается у собак, особенно у самок (80 %) молодого или среднего возраста (датский дог, ротвейлер, пудель, терьер).

Гиперфункция коры надпочечников сопровождается увеличением синтеза кортизола и вызывает развитие *синдрома Кушинга*. Заболевание встречается у собак, чаще у самок среднего возраста. Выраженную генетическую предрасположенность к болезни имеют собаки пород боксер и пудель. В 80—85 % случаев гиперкортицизм у собак развивается вследствие поражения гипофиза (аденома или гипертрофия).

При первичной недостаточности коры надпочечников уровень кортизола уменьшается, а содержание АКТГ по принципу обратной связи — увеличивается (у собак — больше 50 нмоль/л). Диагностика синдрома Кушинга, вызванного аденомой гипофиза, основана на увеличении уровня АКТГ в сыворотке (плазме) крови.

При опухолях коры надпочечников синтез кортизола увеличен, а АКТГ — уменьшен.

В плазме крови бычков черно-пестрой породы 13—14-месячного возраста, по данным В. П. Радченко (1980), содержится 2,1—4,0 мкг/100 мл кортизола (58,0—110 нмоль/л), у коров на 7—8-м месяцах стельности — 9,8—17,4 нг/мл (Черемисинов с соавт., 1990), за 60—45 дней до отела — 2,9—40,3 (14,1 ± 1,66) нмоль/л, в период половой охоты — 13,3—23,2 нмоль/л (Г. Г. Харута, 1999).

9.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНСУЛИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. В основе определения гормона положен принцип энзимсвязанного одношагового сендвичеподобного иммуноанализа. Стандартные, контрольные растворы и сыворотку (плазму) крови инкубируют с антителами инсулина в микротитрационных ячейках, покрытых другими антиинсулиновыми антителами. После отмывания ячейки инкубируют с тетраметилбензидином и после добавления стоп-раствора определяют степень энзимного оборота субстрата измерением абсорбции при длине волны 450 и 620 нм.

Реактивы: 96 полистириновых микротитрационных ячеек (плашка), на внутренние стенки которых нанесены антиинсулиновые антитела;

стандарты инсулина (лиофилизированные) — 1 флакон (обозначенный А) содержит 0 мкМЕ/мл; 5 флаконов (обозначенных B—F), содержат растворы с концентрациями соответственно 3,0, 10,0, 30,0, 100,0 и 300,0 мкМЕ/мл инсулина в человеческой сыворотке с нертутным консервантом. Стандарты А—Е используют при регулярных исследованиях (динамический ряд 3—100 мкМЕ/мл), а стандарты А, С—F — при исследованиях широкого диапазона (10—300 мкМЕ/мл);

контроли инсулина (лиофилизированные) — 2 флакона. Уровни I и II. Содержат высокую и низкую концентрации инсулина в человеческой сыворотке с нертутным консервантом;

инсулиновый антител-энзимный конъюгатный концентрат — 1 флакон содержит 0,3 мл раствора инсулина, конъюгированного с пероксидазой хрена в буфере с нертутным консервантом. Перед использованием растворяют в аналитическом буфере;

аналитический буфер (зеленый) — 1 флакон (28 мл) содержит протеиновый буфер с нертутным консервантом;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит тетраметилбензидин в цитратном буфере с пероксидом водорода;

концентрат моющего раствора — 1 флакон (60 мл) содержит солевой раствор с неионным детергентом;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и, осторожно вращая, тщательно перемешать. Сыворотку (плазму) крови хранить не более 24 ч в холодильнике при 2—8 °С. Для более длительного хранения исследуемые образцы замораживают и хранят при минус 20 °С и ниже. Не рекомендуется исследовать гемолизированные и липемичные образцы.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, настраиваемый на длину волны 450 нм, 600 или 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) Stat Fax-2200, настраиваемый на 500—700 движений в 1 мин; автоматическое промывающее устройство Stat Fax-2600; полуавтоматические дозаторы объемом 5—50, 50—200 и 200—1000 мкл, наконечники; градуированная лабораторная посуда, полистириновые пробирки; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Антител-энзимный конъюгатный раствор: в чистой посуде развести инсулиновый антител-энзимный конъюгатный концентрат в аналитическом буфере (1 : 50), исходя из числа используемых ячеек. Если будет использована вся плашка, необходимо 200 мкл антител-энзимного конъюгатного концентрата инсулина растворить в 10 мл аналитического буфера. Разводить непосредственно перед использованием.

2. Стандарт А восстановленный (0 мкМЕ/мл): во флакон А добавить 1 мл бидистиллированной воды. Хранить до 14 дней в холодильнике при температуре 2—8 °С.

3. Стандарты В—F восстановленные с концентрациями инсулина 3,0, 10,0, 30,0, 100,0 и 300,0 мкМЕ/мл соответственно: в каждый флакон добавить по 0,5 мл бидистиллированной воды. Хранить до 14 дней при температуре 2—8 °С.

4. Моющий раствор: концентрат моющего раствора растворить в 25 частях бидистиллированной воды.

5. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов с ячейками. Остальные стрипы поместить в защитный влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. Для регулярной аналитической процедуры в каждую ячейку микротитрационных стрипов пипеткой вносят по 25 мкл стандартов А—Е, контролей, исследуемой сыворотки (плазмы) крови (*для аналитической процедуры широкого диапазона в ячейки вносят по 10 мкл стандартов, А, С—F, контролей, исследуемой сыворотки (плазмы) крови*). Добавляют по 100 мкл свежеприготовленного антител-энзимного конъюгатного раствора. Инкубируют ячейки при температуре 25 °С в течение 60 мин, встряхивая и

шейкере микротитрационных плашек со скоростью 500—700 движений в 1 мин. Аспирируют и промывают ячейки 5 раз (по 350 мкл моющего раствора), после чего осушают плашку, переворачивая на абсорбирующий материал. В каждую ячейку вносят по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора и инкубируют ячейки в течение 10 мин при комнатной температуре (≈ 25 °С), встряхивая в шейкере при 500—700 движений в 1 мин. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты). Измеряют оптическую плотность растворов каждой ячейки с помощью иммуноферментного плашечного анализатора при длине волны 450 и 620 нм. Результаты учитывают в течение 30 мин после добавления стоп-раствора.

Перед считыванием абсорбции необходимо установить прибор на «0» соответственно с нулевым стандартом (Blank).

Полученные значения стандартов инсулина используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию гормона в исследуемых образцах.

При работе микропланшетного иммуноферментного анализатора с персональным компьютером и наличии соответствующего программного обеспечения стандартная кривая и результаты исследования проб сыворотки (плазмы) крови высчитываются автоматически.

Примечания. Концентрация стандартов приведена в мкМЕ/мл. Для перевода в нг/мл необходимо знать: 25 мкМЕ/мл = 1 нг/мл, т. е. мкМЕ/мл · 0,04 = нг/мл. Сыворотка (предпочтительнее) или плазма крови без следов гемолиза. В качестве антикоагулянта используют гепарин. Кровь для получения плазмы центрифугируют (не позднее чем через 15 мин) в центрифуге с охлаждением при 4 °С. Отделяют сыворотку или плазму в пластиковые пробирки с крышками и замораживают при минус 20 или минус 70 °С. В герметически закрытой пробирке инсулин стабилен 1 день при 4—8 °С и 6 мес при минус 20 °С. Уровень инсулина в плазме выше, чем в сыворотке.

Клиническое значение. Инсулин секретируется β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Инсулин — наиболее важный гормон, регулирующий жировой обмен, и единственный физиологический гормон, обусловливающий снижение уровня глюкозы в крови. Влияние гормона реализуется за мембранным типом — комплекс инсулин-рецептор повышает проницаемость клеточных мембран для глюкозы, обеспечивая этим ее переход из крови в ткани. Инсулин активирует фосфоглюкотрансферазу (гексокиназу) и таким образом обеспечивает превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат с последующим превращением глюкозы в гликоген. Конечным результатом влияния инсулина на обмен углеводов

является уменьшение концентрации глюкозы в крови (*гипогликемия*) и накопление гликогена в мышцах, печени и других органах. При дефиците инсулина клетки теряют способность к использованию глюкозы. Количество ее в крови увеличивается (*гипергликемия*).

Влияние инсулина на обмен липидов заключается в том, что он обеспечивает использование углеводов для синтеза высших карбоновых кислот, а из них — липидов. Кроме того, инсулин ингибирует тканевую липазу, в том числе и за счет торможения образования цАМФ, и этим сокращает расход липидов. Окисление жиров уменьшается, что приводит к ожирению организма.

При уменьшении секреции инсулина происходит повышенный распад аминокислот, усиливается окисление липидов (липолиз) с накоплением свободных жирных кислот, кетоновых тел и холестерола.

У здоровых собак уровень глюкозы в крови составляет 80—120 мг/100 мл (4,4—6,56 ммоль/л). Уровень гликемии выше 200 мг/100 мл (11,1 ммоль/л) считают характерным для сахарного диабета. У сухостойных коров содержание инсулина составляет около 20 мкМЕ/мл (К. Остин, Р. Шорт, 1987), за 60—45 дней до отела — 11,7—67,2 (35,2 ± 3,2) нмоль/л (Г. Г. Харута, 1999).

9.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА (ПТГ) В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. В основе исследования заложен «сендвич-метод», или метод двойных антител. В ячейки, предварительно покрытые ПТГ-антителами, вносят стандарты, контроли, исследуемые пробы и специфические антитела к ПТГ, меченные биотином. При этом образуется комплекс АТ-ПТГ-АТ + биотин. После первой инкубации и промывания ячеек для выявления этого комплекса добавляют иммуноферментный конъюгат, меченный пероксидазой. После второй инкубации и промывания в ячейки добавляют хромогенный раствор (ТМБ), интенсивность окрашивания которого изменяется прямо пропорционально концентрации специфических антител в пробе. Измеряют интенсивность окрашивания при длине волны 450 нм.

Реактивы: 96 полистироловых микротитрационных ячеек, покрытых анти-И-ПТГ;

И-ПТГ стандартный растворитель — 1 флакон (1 мл), обозначенный А, содержит 0 нг/мл И-ПТГ в буферной основе с нертутным консервантом;

И-ПТГ стандарты — 6 флаконов по 0,5 мл (B—G) с концентрациями 10,0, 30,0, 100,0, 250,0, 750,0 и 2000 пг/мл в буферной основе с нертутным консервантом;

И-ПТГ контроли — 2 флакона по 1 мл с уровнями I и II, содержащие низкую и высокою концентрацию И-ПТГ в буферной основе с нертутным консервантом;

И-ПТГ аналитический буфер — 1 флакон (11 мл) содержит фосфатно-буферную основу с нертутным консервантом;

И-ПТГ антител-биотиновый конъюгат — 1 флакон (11 мл) содержит анти-И-ПТГ антитела, конъюгированные с биотином в протеиновом буфере с нертутным консервантом;

стрептавидин-энзимный конъюгатный концентрат — 1 флакон (0,3 мл) содержит стрептавидин-энзимный конъюгат с нертутным консервантом. Развести за 10—15 мин перед использованием в И-ПТГ аналитическом буфере;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит раствор тетраметилбензидина (ТМБ) в цитратном буфере с гидрогенпероксидазой;

моющий концентрат — 1 флакон (100 мл) содержит буферные соли с неионизированными детергентами;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

деионизированная или бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и тщательно перемешать. Образец крови немедленно помещают в воду со льдом. Сыворотку (плазму) крови сепарируют в охлаждаемой центрифуге (4 °С) и хранят при минус 20 °С и ниже. Не рекомендуется исследовать гемолизированные, иктеричные и липемичные образцы.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор, настраиваемый на длину волны 450 нм и перенастраиваемый на 600 или 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) для микропланшет, настроенный на 500—700 встряхиваний в 1 мин; автоматическое промывающее устройство; полуавтоматические пипетки объемом 50 и 100 мкл; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения калибровочного графика (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Моющий раствор: десятикратно развести моющий концентрат бидистиллированной водой (соотношение 1:9).

2. Стрептавидин-энзимный конъюгатный раствор: стрептавидин-энзимный конъюгатный концентрат развести в соотношении 1:50 конъюгатным растворителем соответственно количеству используемых ячеек. Для полной плашки на 96 проб необходимо 240 мкл концентрата развести в 12 мл конъюгатного растворителя.

Примечание. Антител-стрептавидин-конъюгатный концентрат разводят непосредственно перед исследованием.

3. Микротитрационные ячейки: отобрать для исследования необходимое количество стрипов с ячейками. Неиспользуемые стрипы поместить во влагонепроницаемый пакет с десикантом.

Ход определения. В используемые ячейки вносят по 50 мкл стандартов, контролей и исследуемых проб сыворотки (плазмы) крови (в параллелях). Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл антител-биотинового конъюгата. Инкубируют ячейки при комнатной температуре (21—25 °С) в течение 2,5 ч, встряхивая в шейкере микроплат (500—700 встряхиваний в 1 мин). После инкубации при помощи автоматического промывающего устройства сначала проводят аспирацию (откачку содержимого из каждой ячейки), а затем 5 раз промывают каждую лунку 350 мкл моющего раствора. Остатки жидкости в ячейках удаляют, переворачивая и постукивая плашкой по фильтровальной бумаге. Пипеткой вносят в каждую ячейку по 100 мкл стрептавидин-энзимного конъюгатного раствора. Инкубируют плашку со встряхиванием в инкубаторе-шейкере при комнатной температуре (22—25 °С, 500—700 встряхиваний в 1 мин) 30 мин. После аспирации 5 раз промывают каждую ячейку 350 мкл моющего раствора и осушают плашку с ячейками, переворачивая несколько раз на фильтровальную бумагу. В каждую ячейку вносят по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора и инкубируют в шейкере 10—15 мин (22—25 °С, 500—700 встряхиваний в 1 мин), избегая попадания прямых солнечных лучей.

Примечание. Окраска в ячейках может развиваться быстрее или медленнее чем за время, рекомендованное для комнатной температуры, поэтому необходимо визуально наблюдать за развитием окраски для установления оптимального времени инкубации.

После инкубации в каждую ячейку полуавтоматической пипеткой добавляют по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты) для остановки цветной реакции. Измеряют оптическую плотность стандартов, контролей и исследуемых образцов на плашечном иммуноферментном анализаторе (ридере) в режиме двойного излучения: при λ равно 450 нм и 620 нм (не позднее 30 мин после добавления стоп-раствора).

Полученные значения стандартов ПТГ используют для построения стандартной кривой, по которой определяют концентрацию гормона в исследуемых пробах.

Примечание. Все основные характеристики приведены в пг/мл. Для перевода в SI (нмоль/л) необходимо пг/мл × × 0,11 = нмоль/л.

Клиническое значение. Паратгормон совместно с кальцитонином и активными метаболитами витамина D регулирует гомеостаз кальция в организме, что осуществляется путем усиления трансмембранного транспорта кальция из кишечника [совместно с 1,25 $(OH)_2D_3$], повышения реабсорбции кальция в дистальных отделах почечных канальцев и усиления резорбции костной ткани. При снижении содержания кальция в сыворотке крови по принципу обратной связи увеличивается секреция ПТГ, что, в свою очередь, повышает синтез 1,25$(OH)_2D_3$, а последний усиливает резор-

бцию костной ткани путем повышения активности остеокластов, всасывание кальция в кишечнике через регуляцию синтеза СаСБ и его реабсорбцию в дистальных канальцах почек (Л. И. Апуховская с соавт., 2003).

В крови клинически здоровых коров перед отелом содержание паратгормона составляет 4,36 ± 0,19 нг/мл, при послеродовой гипокальциемии — 1,11 ± 0,12 нг/мл (И. Ф. Ганджаев, 1986). У коров с оптимальным содержанием кальция в сыворотке крови (2,26—2,4 ммоль/л) уровень паратгормона составляет 6,1—59,8 пг/мл (О. Ю. Голуб, 2003).

9.7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИТОНИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC SYSTEM LABORATORY, США)

Принцип. В основу определения гормона положен принцип энзимсвязанного двушагового сендвичеподобного иммуноанализа. Стандарты, контроли и исследуемые образцы инкубируют в микротитрационных ячейках, покрытых антикальцитониновыми антителами. После инкубации и отмывания ячейки инкубируют с другими антикальцитониновыми антителами, меченными энзимом пероксидазы хрена. После вторичной инкубации и промывания ячейки инкубируют с субстратом тетраметилбензидина и добавляют стоп-раствор. Определяют степень энзимного оборота субстрата измерением абсорбции на микроплашечном ридере при длине волны 450 и 620 нм. Показатели абсорбции прямо пропорциональны концентрации кальцитонина.

Реактивы: 96 полистириновых микротитрационных ячеек с козьими антикальцитониновыми IgG, иммобилизированными на боковых стенках каждой ячейки;

стандарты кальцитонина (лиофилизированные) — 1 флакон (3,0 мл), обозначенный А, с концентрацией 0 пг/мл; 4 флакона (по 1 мл каждый), обозначенные B—F, с концентрациями 10,0; 50,0; 250,0 и 600 пг/мл кальцитонина в буфере с нертутным консервантом;

контроли кальцитонина (лиофилизированные) — 2 флакона по 1 мл с уровнями I и II, содержащие низкую и высокую концентрации кальцитонина в буфере с нертутным консервантом;

кальцитониновый антител-биотиновый конъюгатный концентрат — 1 флакон содержит 0,4 мл биотинмеченого концентрата кальцитонина в протеиновом буфере с нертутным консервантом. Растворить за 10—15 мин перед использованием в аналитическом буфере;

стрептавидин-энзимный конъюгатный концентрат — 1 темный флакон (0,3 мл) содержит стрептавидин-ХПО концентрат в протеиновом буфере с нертутным консервантом. За 5—10 мин до иссле-

дования растворяют 1 часть реагента в 50 частях аналитического буфера D;

аналитический буфер D —1 флакон (22 мл) содержит буфер с нертутным консервантом;

ТМБ-хромогенный раствор — 1 флакон (11 мл) содержит раствор тетраметиленбензидина (ТМБ) в цитратном буфере с пероксидом водорода;

моющий концентрат I — 1 флакон (100 мл) содержит буферные соли с неионным детергентом. Перед использованием развести в 10 частях бидистиллированной воды;

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл) содержит 0,2 М раствор серной кислоты;

деионизированная и бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и тщательно перемешать путем аккуратного вращения флаконов. Антикоагулянты — гепарин, ЭДТА (1,5 мл/кг), стабилизированные апротинином (трасиполот) из расчета 40 КИЕ/мл (калликреининги-бирующих единиц). В таких условиях кальцитонин в крови стабилен в течение 1 ч при комнатной температуре (Gudor M. и соавт., 1996). Предпочтительна плазма без гемолиза и липемии. После взятия кровь немедленно помещают в воду со льдом и тотчас доставляют в лабораторию или центрифугируют, немедленно сливают плазму и замораживают при минус 20 °С или минус 70 °С. Избегать повторного замораживания и размораживания исследуемых проб.

Оборудование: микропланшетный иммуноферментный анализатор, настраиваемый на длину волны 450 нм и перенастраиваемый на 600 или 620 нм; инкубатор-шейкер (встряхиватель) для микропланшет на 500—700 встряхиваний в 1 мин; автоматическое промывающее устройство; полуавтоматические пипетки на 50 и 100 мкл; фильтровальная бумага для просушивания стрипов; миллиметровая бумага для построения стандартной кривой (при отсутствии программного обеспечения).

Подготовка реагентов к анализу. 1. Моющий раствор: моющий концентрат развести бидистиллированной водой в соотношении 1:10.

2. Кальцитониновый антител-биотиновый конъюгатный раствор: кальцитонин-биотиновый конъюгатный концентрат развести в аналитическом буфере D (1:50). Для полной плашки на 96 проб необходимо отобрать точно 220 мкл кальцитонин-биотинового конъюгатного концентрата и 11 мл аналитического буфера D.

Примечание. Реагент необходимо разводить не более чем за 10—15 мин до начала исследования.

3. Стрептавидин-энзимный конъюгатный раствор: стрептавидин-энзимный конъюгатный концентрат развести в аналитическом буфере D в соотношении 1:50 соответственно количеству используемых ячеек. Для полной плашки на 96 проб необходимо 220 мкл концентрата развести в 11 мл аналитического буфера D.

Примечание. Реагент разводят за 5—10 мин до начала исследования.

4. Микротитрационные ячейки: отобрать необходимое количество ячеек для исследований. Неиспользуемые ячейки поместить в пакет и тщательно его закрыть.

Ход определения. В используемые ячейки вносят по 100 мкл стандартов, контролей и исследуемых проб сыворотки (в параллелях) и добавляют в каждую ячейку по 100 мкл кальцитонинового антител-биотинового конъюгатного раствора. Ячейки инкубируют на протяжении 60 мин, встряхивая в шейкере микроплат (500—700 встряхиваний в 1 мин) при комнатной температуре (22—25 °С). После инкубации ячейки 5 раз промывают при помощи автоматического промывающего устройства, используя по 350 мкл моющего раствора. На последнем этапе используют двойную аспирацию (двойная откачка содержимого из одной лунки). При необходимости удаляют остатки жидкости, переворачивая плашку со стрипами на фильтровальную бумагу. Полуавтоматической пипеткой в каждую ячейку вносят по 100 мкл стрептавидин-энзимного конъюгатного раствора. Инкубируют в инкубаторе-шейкере при том же режиме (22—25 °С, 500—700 встряхиваний в 1 мин) 30 мин. Аспирируют и пятикратно промывают плашку моющим раствором по 350 мкл. Осушают ячейки на фильтровальной бумаге. В каждую ячейку вносят по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора и инкубируют 10—12 мин (22—25 °С, 500—700 встряхиваний в 1 мин), избегая попадания на плашку прямых солнечных лучей. Пипеткой добавляют в каждую ячейку по 100 мкл стоп-раствора (0,2 М раствор серной кислоты) для остановки цветной реакции. Плашку со стрипами помещают в иммуноферментный анализатор (ридер) и в режиме двойного излучения (вначале при 450 нм, затем при 620 нм) считывают абсорбцию растворов в ячейках (не позднее 30 мин после добавления стоп-раствора).

По полученным значениям стандартов строят стандартную кривую, по которой определяют концентрацию кальцитонина в исследуемых пробах сыворотки.

Примечание. Все стандарты кальцитонина представлены в пг/мл. Для перевода в пмоль/л необходимо пг/мл × × 0,29 = пмоль/л.

Клиническое значение. Кальцитонин продуцируют парафолликулярные клетки (С-клетки) щитовидной железы и в понятие «тиреоидные гормоны» обычно не включается. Он не содержит йода и представляет собой полипептид из 32 аминокислотных остатков. Кальцитонин непосредственно влияет на костную ткань

и почки, где расположены его рецепторы, соответственно на остеокласты и на клетки тонкого сегмента восходящего колена петли Генле и начала дистальных извитых канальцев. Он снижает уровень кальция в крови, когда тот превышает 2,5 ммоль/л. Тормозя активность остеокластов, кальцитонин угнетает резорбцию костей, что сопровождается гипокальциемией, гипофосфатемией и снижением активности щелочной фосфатазы. В почках кальцитонин увеличивает экскрецию кальция и фосфора.

Секрецию кальцитонина в физиологических условиях регулирует, по-видимому, только уровень кальция в сыворотке крови. Сведения о содержании кальцитонина в сыворотке крови животных ограничены. У клинически здоровых коров кальцитонина в сыворотке крови содержится 4,11 ± 0,13 пг/мл, у больных послеродовой гипокальциемией несколько ниже (И. Ф. Гаджаев, 1986).

9.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕСТОСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC AUTOMATION INC., США)

Принцип. Метод основан на конкурентном связывании тестостерона исследуемой сыворотки и конъюгата тестостерона-ПХ с постоянным количеством кроличьего антитестостерона. В ячейки, покрытые антикроличьими IgG, вносят по 10 мкл тестостероновых стандартов, контролей и исследуемых проб сыворотки, добавляют 100 мкл конъюгата тестостерона-ПХ и 50 мкл кроличьего антитестостеронового реагента. Инкубируют при 37 °С. Во время инкубации известное количество меченного ПХ тестостерона конкурирует с эндогенным тестостероном в стандарте, пробе или контрольной сыворотке за определенное число мест связывания на специфических антителах к тестостерону. При этом количество связанного меченного пероксидазой тестостерона обратно пропорционально содержанию эндогенного тестостерона в исследуемой сыворотке. Несвязанный конъюгат меченого тестостерона вымывают из ячеек. После этого в ячейки добавляют ТМБ-реагент. Развитие окраски прекращают добавлением стоп-раствора (кислоты хлористоводородной) и измеряют абсорбцию на ридере при длине волны 450 нм.

Реактивы: 96 микротитрационных ячеек, покрытых козьими антикроличьими IgG;

референс-стандарты тестостерона — 6 флаконов по 0,5 мл с концентрациями 0,0, 0,1, 0,5, 2,0, 6,0 и 18 нг/мл. Готовы к использованию;

кроличий антитестостероновый реагент (розового цвета) — 1 флакон (7 мл);

конъюгат тестостерона и ПХ (голубого цвета) — 1 флакон (12 мл);

тестостероновые контроли — 2 флакона по 0,5 мл с уровнями I и II. Готовы к использованию;

ТМБ-реагент — 1 флакон (11 мл);

стоп-раствор (кислота хлористоводородная) — 1 флакон (11 мл); деионизированная или бидистиллированная вода.

Примечания. Материалом для исследования служит сыворотка или плазма без гемолиза и липидемии. Антикоагулянт — гепарин. Образец крови помещают в воду со льдом и тотчас центрифугируют, отделяют сыворотку или плазму, охлаждают в холодильнике или замораживают при минус 20 °С. Сыворотку или плазму хранят 1 день при комнатной температуре, 3 дня при 4—8 °С и 1 год при минус 20 °С.

Оборудование: микроплашечный иммуноферментный анализатор (ридер); инкубатор-шейкер для микропланшет; автоматическое промывающее устройство; полуавтоматические пипетки на 10, 50, 100 мкл и 1,0 мл; фильтровальная бумага или бумажные салфетки для просушивания стрипов; миллиметровая бумага.

Подготовка реагентов к анализу. Перед использованием все реагенты и пробы необходимо привести к комнатной температуре (18—25 °С). Сыворотки, в которых уровень тестостерона свыше 18 нг/мл, следует развести разбавителем сыворотки.

Ход определения. Закрепляют в штативе необходимое количество ячеек. Вносят по 10 мкл стандартов, контролей и исследуемых проб (в параллелях) в соответствующие ячейки. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл конъюгата тестостерона ПХ и по 50 мкл кроличьего антитестостеронового реагента. Тщательно и аккуратно перемешивают в течение 30 с. Инкубируют в инкубаторе-шейкере при 37 °С на протяжении 90 мин. При помощи автоматического промывающего устройства исследуемые ячейки 5 раз промывают бидистиллированной водой. Остатки жидкости в ячейках удаляют, переворачивая и постукивая плашкой по фильтровальной бумаге. Вносят в каждую ячейку по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора, осторожно перемешивают в течение 5 с. Инкубируют при комнатной температуре (18—25 °С) 20 мин. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл стоп-раствора. Осторожно перемешивают 30 с. Очень важно, чтобы голубая окраска полностью перешла в желтую. Считывают абсорбцию на ридере при длине волны 450 нм в течение 15 мин.

По полученным результатам стандартов строят калибровочную кривую и по ней определяют концентрацию гормона в исследуемых пробах сыворотки. При подсчете результаты предварительно разведенных образцов умножают на фактор разведения.

Клиническое значение. Тестостерон — это наиболее активный мужской половой гормон, который вырабатывается главным образом интерстициальными клетками семенников; у самок — в надпочечниках, фолликулах, желтом теле, однако в 10—15 раз меньшем количестве. Секрецию тестостерона стимулируют гонадотропные гормоны: фолликулотропин и лютеотропин. У самцов тестостерон специфически действует на развитие и функцию орга-

нов размножения, созревание спермиев и сохранение их жизнеспособности, развитие вторичных половых признаков. Кроме того, повышает основной обмен, усиливает синтез белков (оказывает анаболическое действие).

Повышение уровня тестостерона наблюдают при патологии гипоталамогипофизарной системы, опухолях семенников и яичников, гиперплазии надпочечников.

При недостаточной секреции тестостерона, фолликулотропина (ФСГ), лютеотропина (ЛГ) развивается *гипогонадизм*. Различают первичный и вторичный гипогонадизм. Причинами первичного являются врожденные аномалии, которые сопровождаются недостаточным развитием семенников и мошонки, двусторонний крипторхизм или орхит, инфекционный эпидидимит баранов. Вторичный гипогонадизм вызывает недостаточная секреция гонадотропных гормонов — ФСГ и ЛГ.

В сыворотке крови коров в период половой охоты содержание тестостерона составляет в среднем 116,8 ± 9,0 пг/мл (В. С. Шипилов с соавт., 1987), на 7-м месяце стельности 241,4 ± 40,7 пг/мл (К. Г. Дашукаева, 1992), за месяц до отела 6,0—7,0 нмоль/л и через 15—30 дней после отела — 3,2—3,5 нмоль/л (В. И. Еременко, 2000).

9.9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОГЕСТЕРОНА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC AUTOMATION INC., США)

Принцип. Метод основан на конкурентном связывании прогестерона исследуемой сыворотки и конъюгата прогестерона-ПХ (меченного пероксидазой хрена) с постоянным количеством кроличьего антипрогестерона. В ячейки, покрытые антикроличьими IgG, добавляют стандарты, контроли и исследуемые пробы сыворотки, конъюгат прогестерона-ПХ и кроличий антипрогестероновый реагент. Во время инкубации при комнатной температуре (18—25 °С) известное количество меченного пероксидазой хрена прогестерона конъюгирует с эндогенным прогестероном в стандарте, пробе и контроле за определенное число мест связывания на специфических антителах к прогестерону. При этом количество связанного меченного пероксидазой прогестерона обратно пропорционально содержанию эндогенного прогестерона в исследуемой сыворотке.

Несвязанный конъюгат меченого прогестерона отмывают из ячеек, добавляют хромогенный раствор и после развития окраски добавляют стоп-раствор для остановки цветной реакции. Считывание результатов проводят на ридере при длине волны 450 нм.

Реактивы: 96 микротитрационных ячеек, покрытых козьим антикроличьим IgG;

референс-стандарты прогестерона — 6 флаконов по 0,5 мл с концентрациями 0,0, 0,5, 3,0, 10,0, 25,0 и 50,0 нг/мл. Готовы к использованию;

кроличий антипрогестероновый реагент (розового цвета) — 1 флакон (7 мл);

конъюгат прогестерона и ПХ (голубого цвета) — 1 флакон (12 мл);

прогестероновые контроли — 2 флакона по 0,5 мл с уровнями I и II. Готовы к использованию;

ТМБ-реагент — 1 флакон (11 мл);

стоп-раствор — 1 флакон (11 мл);

деионизированная или бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и тщательно перемешать. Сыворотка или плазма крови, свободная от гемолиза. Антикоагулянт — ЭДТА. Кровь из вены берут в пластиковую пробирку, которую помещают в воду со льдом, центрифугируют, сливают во вторичную пробирку, охлаждают (4 °С) или замораживают. Прогестерон стабилен в сыворотке и плазме в герметично закрытой пробирке в течение 1 дня при 4—8 °С, при минус 20 °С — длительное время.

Оборудование: микроплашечный иммуноферментный анализатор (ридер); инкубатор-шейкер для микропланшет; автоматическое промывающее устройство; полуавтоматические пипетки на 25, 50, 100, 200 мкл и 1,0 мл; фильтровальная бумага или бумажные салфетки для просушивания стрипов; миллиметровая бумага.

Подготовка реагентов к анализу. Перед использованием все реагенты и пробы необходимо привести к комнатной температуре (18—25 °С). Сыворотки, в которых ожидается концентрация прогестерона свыше 50 нг/мл, следует предварительно развести разбавителем сыворотки.

Ход определения. Закрепляют в штативе необходимое количество ячеек. Вносят по 25 мкл стандартов, контролей и исследуемых проб (в параллелях) в соответствующие ячейки. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл конъюгата прогестерона-ПХ и по 50 мкл кроличьего антипрогестеронового реагента. Тщательно и аккуратно перемешивают в течение 30 с. Инкубируют при комнатной температуре (18—25 °С) на протяжении 90 мин. При помощи автоматического промывающего устройства исследуемые ячейки пятикратно промывают бидистиллированной водой. Остатки жидкости в ячейках удаляют, переворачивая и постукивая плашкой по фильтровальной бумаге. Вносят по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора в каждую ячейку, осторожно перемешивают в течение 5 с. Инкубируют при комнатной температуре (18—25 °С) 20 мин. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл стоп-раствора. Осторожно перемешивают 30 с. Очень важно, чтобы голубая окраска полно-

стью перешла в желтую. Считывают абсорбцию на ридере при длине волны 450 нм в течение 15 мин.

По полученным результатам стандартов строят калибровочную кривую и по ней определяют концентрацию гормона в исследуемых пробах сыворотки. При подсчете результаты предварительно разведенных образцов умножают на фактор разведения.

Клиническое значение. Прогестерон — женский половой гормон, который синтезируется желтым телом, частично надпочечниками и плацентой, у самцов — семенниками. Прогестерон обладает широким спектром воздействия на внутренние органы, но основное его влияние направлено на репродуктивные органы: тормозит сократительную функцию гладких мышц гениталий, содействует закрытию канала шейки матки и образованию в нем слизистой пробки при беременности, обеспечивает секрецию эндометрия, маточных желез, иммунную толерантность к эмбриону и детской части плаценты. Этот гормон является исключительно важным в регуляции функции надпочечников, яичников и плаценты во время беременности. Определение прогестерона используют для установления овуляции и изучения лютеиновой фазы, диагностики беременности на самых ранних стадиях.

Количество прогестерона зависит от физиологического состояния животных. В сыворотке крови коров в период стадии полового возбуждения его содержание колеблется в пределах 0,74—1,20 нг/мл, половой охоты — 0,36—0,56 нг/мл. В период стельности физиологический уровень гормона составляет 2,2—5,5 нг/мл, в том числе на 7-м месяце — 3,20—3,88, на 8-м — 2,82—3,36 нг/мл (А. Г. Нежданов с соавт., 1989). За 2—3 нед до отела содержание прогестерона резко уменьшается и во время отела определяется минимальное его количество. По уровню его в сыворотке крови на 21—24-й дни после осеменения можно определять стельность коровы (В. Д. Недвига, Г. Г. Харута, 2002), за 60—45 дней до отела — прогнозировать течение родов и послеродового периода (Г. Г. Харута, 1999).

В начале половой охоты кобыл содержание прогестерона в плазме крови составляет в среднем 1,23 ± 0,45 нг/мл, через 12 ч после овуляции — 0,75 ± 0,43, через 2 дня после окончания стадии полового возбуждения — 1,82 ± 0,74, на 6—8-й дни полового цикла — 3,79 ± 0,95, на 11—14-й дни — 4,23 ± 1,4, а на 15—17-й дни — 3,21 ± 1,39 нг/мл.

Наивысшая концентрация прогестерона в плазме крови кобыл бывает на 2-м и 3-м месяцах жеребости (7,12 ± 2,10 и 6,81 ± 1,15 нг/мл), на 4—6-м месяцах содержание его уменьшается с 5,24 ± 0,82 до 2,80 ± ± 0,40 нг/мл, а на 7—11-м увеличивается с 3,63 ± 0,65 до 5,64 ± ± 0,76 нг/мл (Д. В. Повалюк, 2001).

У сук в течение стадии возбуждения полового цикла (длительность 7—11 дней) уровень прогестерона составляет 0,4 ± 0,1 нг/мл, в начале течки — 1,1 ± 0,1, т. е. в этот период прогестагенная активность яичников находится на низком уровне. В конце эстраль-

ного периода желтые тела становятся функционально активными и поэтому содержание прогестерона увеличивается до 5,3 ± 0,3 нг/мл. После окончания периода половой охоты наступает стадия торможения полового цикла (длительность ее 50—60 дней). В начале этой стадии концентрация прогестерона составляет 17,4 ± 0,6 нг/мл, в середине щенности (на 30-й день) — 26,8 ± 0,7 нг/мл, на 55-е сутки щенности — 4,3 ± 0,3 нг/мл. После стадии торможения наступает период полового покоя длительностью 115—130 сут. Уровень прогестерона в начале и в конце этого периода стабилен — 0,9 ± 0,1 нг/мл (П. В. Ковалев, 2002).

9.10. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭСТРАДИОЛА В СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ КРОВИ (DIAGNOSTIC AUTOMATION INC., США)

Принцип. Метод основан на конкурентном связывании эстрадиола исследуемой сыворотки и конъюгата эстрадиола-ПХ (пероксидазы хрена) с постоянным количеством кроличьего антиэстрадиола. В ячейки, покрытые антикроличьими IgG, добавляют стандарты, контроли и исследуемые пробы сыворотки, конъюгат эстрадиола-ПХ и кроличий антиэстрадиоловый реагент. Во время инкубации при комнатной температуре (18—25 °С) известное количество меченного пероксидазой хрена эстрадиола конъюгирует с эндогенным эстрадиолом в стандарте, пробе и контроле за определенное число мест связывания на специфических антителах к эстрадиолу. При этом количество связанного меченного пероксидазой эстрадиола обратно пропорционально содержанию эндогенного эстрадиола в исследуемой сыворотке.

Несвязанный конъюгат меченого эстрадиола отмывают из ячеек, добавляют хромогенный раствор и после развития голубой окраски добавляют стоп-раствор для остановки цветной реакции. Считывание результатов проводят на ридере при длине волны 450 нм.

Реактивы: 96 микротитрационных ячеек, покрытых козьими антикроличьими IgG;

референс-стандарты эстрадиола, готовые к использованию — 6 флаконов по 0,5 мл с концентрациями 0,0, 10,0, 30,0, 100,0, 300,0 и 1000,0 пг/мл;

кроличий антиэстрадиоловый реагент (розового цвета) — 1 флакон (7 мл);

конъюгат эстрадиола и ПХ (голубого цвета) — 1 флакон (12 мл);

эстрадиоловые контроли — 2 флакона по 0,5 мл с уровнями I и II. Готовые к использованию;

ТМБ-реагент — 1 флакон (11 мл);

стоп-раствор (кислота хлористоводородная) — 1 флакон (11 мл);

деионизированная или бидистиллированная вода.

Примечание. Все реагенты и пробы перед исследованием следует привести к комнатной температуре (25 °С) и

тщательно перемешать. Материал для анализа — сыворотка или плазма крови без гемолиза и липидемии. Пробирку с кровью помещают в воду со льдом. Следует как можно быстрее отцентрифугировать сыворотку или плазму, охладить до 4—8 °С или заморозить. Эстрадиол стабилен в сыворотке или плазме при 4—8 °С 1 день, при минус 20 °С — длительное время.

Оборудование: микроплашечный иммуноферментный анализатор (ридер); автоматическое промывающее устройство; полуавтоматические пипетки на 25, 50, 100, 200 мкл и 1,0 мл; фильтровальная бумага или бумажные салфетки для просушивания стрипов; миллиметровая бумага.

Подготовка реагентов к анализу. Перед использованием все реагенты и пробы необходимо привести к комнатной температуре (18—25 °С). Сыворотки, в которых ожидается концентрация эстрадиола свыше 1000 пг/мл, следует предварительно развести разбавителем сыворотки.

Ход определения. Закрепляют в штативе необходимое количество ячеек. Вносят по 25 мкл стандартов, контролей и исследуемых проб (в параллелях) в соответствующие ячейки. Добавляют в каждую ячейку по 100 мкл конъюгата эстрадиола-ПХ и по 50 мкл кроличьего анти-эстрадиолового реагента. Тщательно и аккуратно перемешивают в течение 30 с. Инкубируют при комнатной температуре (18—25 °С) на протяжении 90 мин. При помощи автоматического промывающего устройства исследуемые ячейки пятикратно промывают бидистиллированной водой. Остатки жидкости в ячейках удаляют, переворачивая и постукивая плашкой по фильтровальной бумаге. Вносят в каждую ячейку по 100 мкл ТМБ-хромогенного раствора, осторожно перемешивают в течение 5 с. Инкубируют при комнатной температуре (18—25 °С) 20 мин. Добавляют по 100 мкл стоп-раствора (кислоты хлористоводородной) в каждую ячейку. Осторожно перемешивают 30 с. Очень важно, чтобы голубая окраска полностью перешла в желтую. Считывают абсорбцию на ридере при длине волны 450 нм в течение 15 мин.

По полученным результатам стандартов строят калибровочную кривую и по ней определяют концентрацию гормона в исследуемых пробах сыворотки. При подсчете результаты предварительно разведенных образцов умножают на фактор разведения.

Клиническое значение. Эстрадиол — естественный эстроген, секретируемый преимущественно яичниками и в незначительных количествах корой надпочечников, у беременных плацентой, у самцов семенниками. Эстрадиол обеспечивает развитие, дифференцировку и функциональную активность органов размножения самок, стимулирует рост и развитие фолликулов, повышает чувствительность яичников к действию гонадотропинов. Он ускоряет рассасывание желтых тел и наступление очередного полового цик-

ла. Под влиянием эстрадиола активируется влияние окситоцина на мышцы матки, повышается их сократительная функция, слегка открывается канал шейки матки во время половой охоты.

Количество эстрадиола в сыворотке (плазме) крови зависит от физиологического состояния животных. В период половой охоты коров оно колеблется в пределах 15—25 пг/мл (В. С. Шипилов с соавт., 1987) и доминирует над уровнем прогестерона, на 7-м месяце стельности — 209,2 ± 11,6; на 8-м — 232,3 ± 8,2 пмоль/л (Г. А. Черемисинов с соавт., 1990). Максимальный уровень эстрадиола наблюдался за 2—3 нед до родов, в период родов и в начале стадии полового возбуждения (А. Г. Нежданов с соавт., 1986). По данным Г. Г. Харуты (1999), содержание эстрадиола в сыворотке крови за 60—45 дней до отела можно использовать для прогнозирования течения родов: при физиологическом течении оно составляет 2,26 ± 0,13 нмоль/л, а при последующей субинволюции — 1,37 ± 0,38 нмоль/л.

У кобыл в начале половой охоты количество 17β-эстрадиола составляет 42,05 ± 5,94 пг/мл, через 12 ч после овуляции — 23,61 ± 3,14, через 2 дня после окончания стадии полового возбуждения содержание гормона уменьшается до 13,26 ± 2,34 пг/мл, на 6—8-й день оно составляло 10,75 ± 2,97, на 11—14-й день полового цикла — 26,7 ± 3,18; на 17—18-й день — 16,0 ± 1,59 пг/мл (Д. В. Подвалюк, 1997). В первые 3 мес жеребности количество эстрадиола составляет 46,1 ± 10,37 пг/мл; на 5—11-й месяц — уменьшается с 44,46 ± 7,11 до 16,6 ± 3,08 пг/мл, в период родов содержание эстрадиола составляет 17,0 ± 5,93 пг/мл (Д. В. Подвалюк, 1997).

Изложенные методы иммуноферментного определения гормонов апробируют В. В. Сахнюк, О. К. Голуб в Белоцерковском государственном аграрном университете под руководством академика УААН В. И. Левченко.

Условия подготовки образцов крови к определению гормонов изложены в справочном пособии «Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап». (М.: Юнимед-пресс, 2003. — С. 206—246).

ГЛАВА 10

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОМЕОСТАЗА МОЛОДНЯКА

Физиологические показатели, т. е. показатели нормы — предмет дискуссии специалистов ветеринарной медицины, биохимиков, физиологов, ибо категория «норма» всегда сопоставляется с понятием о здоровье человека и животных. В наиболее общем плане здоровье, или физиологическое состояние, или норма — это форма существования организма, при которой его структура и функции соответствуют друг другу, а система регуляции этой взаимосвязи на различных уровнях дает возможность полностью реализовать генетический потенциал животных в конкретных условиях внешней среды. Норма определяется комплексом показателей, которые характеризуют функциональное состояние организма в конкретных условиях.

В биологии, вероятно, определить норму — одна из самых трудных задач, тем более у молодых животных. Возрастная динамика физиологических, биохимических и иммунологических показателей у животных в ранний период жизни отражает адаптационно-компенсаторные процессы становления организма, формирования динамического постоянства внутренней среды, называемого гомеостазом. В этом заключается отличие в понимании тех или иных показателей у молодняка от взрослых животных.

10.1. МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И УРОВЕНЬ ГЕМОГЛОБИНА

При определении физиологических показателей количества эритроцитов и гемоглобина необходимо обращать внимание на цвет видимых слизистых оболочек, прежде всего конъюнктивы, и величину гематокрита, ибо обезвоживание, которое встречается довольно часто у молодняка, может привести к ошибочному заключению. Количество эритроцитов и содержание гемоглобина в крови новорожденных животных связано с характером внутриутробного развития, обеспеченностью матерей питательными и биологически активными веществами. У здоровых телят 1—3-дневного возраста со-

держание гемоглобина в крови колеблется в пределах 95,0—130,0 г/л, количество эритроцитов — 5,0—9,0 Т/л, величина гематокрита составляет 30,0—40,0 %, содержание гемоглобина в одном эритроците (СГЭ) — 12,0—20,0 пг, объем эритроцита — 40—60 мкм^3 (табл. 61). В течение первого месяца жизни содержание гемоглобина, величина гематокрита и средний объем эритроцитов постепенно уменьшаются, а количество эритроцитов остается стабильным [32]*.

61. Показатели эритроцитопоэза у клинически здоровых телят, $n = 50$ (В. М. Соколюк, 1997)

Возраст, дней	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, Т/л	СГЭ, пг	Гематокрит, %	Средний объем эритроцитов, мкм^3
1—3	95,0—130,0	5,0—9,0	12 0—20,0	30,0—40,0	40,0—60,0
	112,0 ± 1,4	7,2 ± 0,3	16,0 ± 0,4	38,0 ± 1,0	52,0 ± 1,0
10	90,0—125,0	5,0—9,0	10,0—20,0	28,0—40,0	35,0—60,0
	107,0 ± 1,0	7,0 ± 0,2	15,7 ± 0,4	35,0 ± 1,0	49,0 ± 2,0
20	90,0—125,0	5,0—9,0	10,0—19,0	25,0—40,0	40,0—56,0
	108,0 ± 1,0	7,5 ± 0,2	14,7 ± 0,4	35,0 ± 1,0	48,0 ± 1,0
30—40	90,0—120,0	5,0—8,5	14,0—19,0	25,0—40,0	40,0—56,0
	103,0 ± 1,4	6,7 ± 0,2	16,3 ± 0,5	32,0 ± 1,0	46,0 ± 2,0

Несколько иные данные морфологического состава крови приводит Н. И. Блинов (табл. 62).

62. Показатели крови у новорожденных телят (Н. И. Блинов, 1985)

Показатель	Возраст, дней		
	1 (до поения молозивом)	2—5	9—12
Эритроциты, Т/л	5,1—7,3	4,9—6,44	6,4—6,75
Гемоглобин, г/л	106,5—114,4	90,0—114,4	114,0—120,5
Лейкоциты, Г/л (10^9/л)	5,0—9,3	7,8—9,5	9,3—12,5
Лейкограмма, %:			
базофилы	0—0,1	0—0,2	0—1,0
эозинофилы	0—2,5	0—3,6	0,5—6,0
нейтрофилы:			
миелоциты	0—0,1	0—0,1	0—0,1
юные	5—18	5—15	1—4
палочкоядерные	8—21	10—24	1—6
сегментоядерные	46—64	27— 59	24—62
лимфоциты	7,5—18,5	20—36	20—64
моноциты	0—1,9	0—4,5	1—5

*См. источник в конце главы.

У щенков собак 2—12-месячного возраста гемоглобина содержится значительно больше (150,0—215,0 г/л), величина гематокрита выше (0,3—0,5 л/л), а количество эритроцитов примерно такое же, как и у телят (4,5—8,0 Т/л) [14]. Поэтому эритроциты собак больше по объему и более насыщены гемоглобином.

Показатели крови у жеребят, поросят и цыплят-бройлеров приведены в таблицах 63—65 [7, 9, 29].

63. Показатели эритроцитопоэза у жеребят (В. И. Головаха, 2003)

Возраст	Эритроциты, Т/л	Гемоглобин, г/л	СГЭ, пг	Гематокрит, %
1—5 дней	5,0—11,0 8,0 ± 0,5	120,0—195,0 146,0 ± 4,2	12,5—50,0 21,5 ± 2,3	30,0—45,0 39,0 ± 1,0
10 дней	4,5—9,5 7,5 ± 0,4	120,0—180,0 146,0 ± 4,4	11,0—46,0 20,5 ± 1,6	26,0—55,0 39,0 ± 1,3
20 дней	4,5—9,5 7,5 ± 0,3	100,0—160,0 140,0 ± 3,3	14,0—27,0 19,0 ± 0,7	26,0—50,0 36,0 ± 1,1
30 дней	6,0—13,0 8,5 ± 0,4	110,0—180,0 144,0 ± 2,4	10,0—26,0 18,0 ± 0,7	30,0—50,0 39,0 ± 1,2
3 мес	6,5—13,0 8,5 ± 0,5	120,0 — 190,0 154,0 ± 4,6	14,0—28,0 19,5 ± 0,8	34,0—60,0 40,0 ± 1,0
6 мес	5,0—10,5 7,0 ± 0,5	110,0—180,0 146,0 ± 3,6	16,0—40,0 23,0 ± 1,5	26,0—58,0 45,0 ± 1,6
9 мес	5,0—10,5 8,1 ± 0,3	110,0—165,0 139,0 ± 5,4	10,0—31,5 18,0 ± 1,2	33,0—42,0 36,0 ± 0,9
12 мес	4,5—12,5 8,0 ± 0,5	90,0—165,0 129,0 ± 5,8	10,0—23,0 17,0 ± 1,2	28,0—44,0 36,0 ± 1,3

64. Показатели крови у поросят (М. Г. Николадзе, 2002)

Показатель	Возраст, дней				
	2—4	9—11	16—18	24—28	30—32
Гемоглобин, г/л	86,0 ± 2,90	107,0 ± 3,11	109,0 ± 2,89	108,0 ± 2,62	109,0 ± 3,07
Эритроциты, 10^{12}/л	4,60 ± 0,09	4,96 ± 0,12	5,2 ± 0,11	5,3 ± 0,12	5,3 ± 0,15
СГЭ, пг	18,8 ± 0,63	21,5 ± 0,69	21,0 ± 0,69	20,3 ± 0,73	20,7 ± 0,74
Диаметр эритроцитов, мкм	6,0 ± 0,04	6,5 ± 0,13	6,5 ± 0,14	6,5 ± 0,11	6,4 ± 0,09
Лейкоциты, 10^9/л	6,9 ± 0,34	7,5 ± 0,47	7,7 ± 0,43	7,7 ± 0,40	7,7 ± 0,51
Гематокритная величина, л/л	0,30 ± 0,005	0,38 ± 0,008	0,45 ± 0,0010	0,44 ± 0,009	0,41 ± 0,008
Гематокритная величина, %	30,0 ± 0,5	38,0 ± 0,80	45,0 ± 0,10	44,0 ± 0,90	41,0 ± 0,80
Ретикулоциты, %	46,5 ± 4,12	20,8 ± 2,61	25,5 ± 2,05	9,6 ± 1,40	4,3 ± 0,86
Сидероциты,%	3,17 ± 0,57	4,75 ± 0,46	5,87 ± 0,53	7,78 ± 0,87	4,72 ± 0,47

Продолжение табл. 64

Показатель	Возраст, дней				
	2—4	9—11	16—18	24—28	30—32
Нормобласты, на 100 эритроцитов	2,10 ± 0,25	0,70 ± 0,09	0,14 ± 0,02	0,1 ± 0,01	0,00 ± 0,00

65. Показатели крови цыплят-бройлеров (И. М. Карпуть, 1993)

Показатель	Возраст, дней				
	6	13	19	27	37
Гемоглобин, г/л	92,0 ± 3,7	100,0 ± 5,5	110,0 ± 3,2	105,0 ± 1,0	70,0 ± 2,2
Эритроциты, Т/л	3,7 ± 0,3	3,8 ± 0,2	2,7 ± 0,2	2,1 ± 0,3	3,5 ± 0,8
Тромбоциты, Г/л	1,1 ± 0,1	5,6 ± 0,6	3,1 ± 0,6	3,5 ± 0,7	4,2 ± 0,7
Лейкоциты, Г/л	44,6 ± 9,7	67,2 ± 12,0	28,4 ± 3,6	19,3 ± 3,4	45,3 ± 10,3
Общий белок, г/л	31,9 ± 2,6	35,6 ± 1,4	36,2 ± 1,3	41,9 ± 0,9	37,0 ± 0,6
Иммуноглобулины, г/л	7,0 ± 0,72	7,7 ± 0,86	8,0 ± 0,31	7,8 ± 0,2	8,5 ± 0,1

Уменьшение количества эритроцитов (*олигоцитемия*) и гемоглобина (*олигохромемия*) или одного из этих показателей в единице объема крови характеризует патологическое состояние организма — *анемию*. В зависимости от этиологии различают постгеморрагическую, гипопластическую, гемолитическую и апластическую анемии, по насыщенности эритроцитов гемоглобином — гипо-, нормо- и гиперхромные; по размеру эритроцитов — микро-, нормо- и макроцитарные; по способности костного мозга к регенерации — регенераторные, гипо- и арегенераторные.

Причина гипопластической анемии — дефицит в рационе животных протеина, микроэлементов (меди, железа, кобальта, марганца), витаминов (B_2, B_6, B_{12}, B_c, аскорбиновой кислоты, токоферола) — алиментарно-дефицитная анемия и угнетение функции костного мозга различными токсинами — миелотоксическая анемия.

Анемии развиваются также вследствие нарушения аминокислотного состава глобина (гемоглобинозы). Их разделяют на две группы: а) гемоглобинопатии, причины которых — наследственное изменение структуры отдельных цепей нормального глобина, обусловленных заменой одной или нескольких аминокислот. Например, замены только одной аминокислоты — глутаминовой на валин в β-цепи глобина достаточно для развития тяжелой наследственной болезни — серповидноклеточной анемии; б) талассемии, обусловленные наследственным нарушением синтеза одной из нормальных цепей глобина (не синтезируется вообще или синтезируется в незначительном количестве). Анемии развиваются так-

же вследствие нарушения синтеза гема, в котором участвуют различные ферменты, железо, витамины B_{12} и B_c.

Увеличение количества эритроцитов в крови (*полицитемия, эритроцитоз*) бывает физиологическим и патологическим.

Физиологическая полицитемия наблюдается при гипоксическом состоянии новорожденных (длительные тяжелые роды), снижении парциального давления кислорода, вследствие чего в кровеносную систему выбрасываются эритроциты из кровяных депо и усиливается эритроцитопоэз.

Патологическая полицитемия бывает относительной и абсолютной. Первая обусловлена потерей организмом воды и сгущением крови вследствие болезней, которые сопровождаются диареей, рвотой, развитием транссудатов и экссудатов. Параллельно увеличивается количество гемоглобина (*плейохромия*). Абсолютная патологическая полицитемия обусловлена усилением эритропоэтической функции костного мозга при болезнях сердца (перикардит, пороки) и легких (пневмония).

Популяционный состав эритроцитов периферической крови у телят 1—30-дневного возраста непостоянен. С 1 до 3-дневного возраста у телят возрастает популяция «старых» и «зрелых» эритроцитов, но с 6-дневного возраста постепенно нарастает популяция «молодых» эритроцитов и уменьшается количество «зрелых» клеток (табл. 66).

66. Популяционный состав эритроцитов клинически здоровых телят, % (В. П. Москаленко, 1999)

Возраст, дней	Популяции эритроцитов		
	«старые»	«зрелые»	«молодые»
1	6,8 ± 0,56	25,7 ± 1,34	67,5 ± 1,43
6	7,1 ± 0,58	29,6 ± 2,2	63,3 ± 2,33
10	7,3 ± 0,58	25,3 ± 1,1	67,4 ± 1,60
20	6,4 ± 0,35	24,5 ± 0,84	69,1 ± 1,0
30	6,0 ± 0,49	20,6 ± 0,56	73,4 ± 0,58

При гипопластической анемии «старые» эритроциты элиминируются и в кровеносное русло выбрасываются «зрелые» и «молодые» клетки [12]. У больных бронхопневмонией телят в кровь интенсивно поступают популяции «молодых» функционально не созревших эритроцитов, но в дальнейшем, при тяжелом течении болезни вследствие истощения компенсаторных возможностей происходит быстрое «старение» «молодых» и «зрелых» эритроцитов [28].

Содержание кальция в эритроцитах телят уменьшается в 3—6-дневном возрасте по сравнению с однодневными и стабилизируется в 20-дневном, положительно коррелирует с количеством общих липидов в мембранах эритроцитов.

67. Содержание кальция (ммоль/л), фосфора и 2,3-ДФГ (мкмоль/мл суспензии) в эритроцитах телят (В. П. Москаленко, 1999)

Возраст, дней	Кальций	Фосфор		2,3-ДФГ
		общий	неорганический	
1	1,12 ± 0,07	9,3 ± 0,37	3,1 ± 0,27	6,2 ± 0,25
6	0,77 ± 0,03	11,9 ± 0,50	2,3 ± 0,24	9,6 ± 0,54
10	0,69 ± 0,01	10,8 ± 0,20	1,7 ± 0,09	9,1 ± 0,27
20	0,74 ± 0,01	10,7 ± 0,20	2,3 ± 0,20	8,4 ± 0,13
30	0,76 ± 0,02	9,4 ± 0,37	2,0 ± 0,23	7,4 ± 0,33

Примечание. 2,3-ДФГ — 2,3-дифосфоглицериновая кислота.

Содержание общего фосфора в эритроцитах, наоборот, в первые 3 дня жизни увеличивается и остается стабильным до 20-дневного возраста, а затем уменьшается и у 30-дневных телят не отличается от исходного показателя (табл. 67).

Уровень 2,3-дифосфоглицериновой кислоты (2,3-ДФГ) в эритроцитах телят однодневного возраста колеблется в пределах 5,0—6,6 мкмоль/мл суспензии, затем постепенно увеличивается и ее часть в общем количестве фосфора в эритроцитах 20—30-дневных телят составляет 76—84 % [12]. Таким образом, содержание 2,3-ДФГ у телят значительно выше, чем у молодняка 3—12-месячного возраста и коров, поэтому высокий уровень 2,3-ДФГ у телят необходимо рассматривать как адаптационную реакцию организма, направленную на стабилизацию газообмена. Это особенно заметно у телят, больных гипопластической анемией, когда содержание 2,3-ДФГ возрастает до 11,3 ± 1,0 — 12,0 ± 0,5 мкмоль/мл суспензии эритроцитов [12], и при бронхопневмонии молодняка, при которой уровень 2,3-ДФГ увеличивается в 1,2—1,8 раза по сравнению со здоровыми телятами [28]. Повышение содержания 2,3-ДФГ в эритроцитах уменьшает сродство гемоглобина к кислороду и способствует более интенсивной диффузии его в ткани, поэтому расценивается как компенсаторная реакция на развитие гипоксии.

Лейкоциты. Количество лейкоцитов у однодневных телят больше, чем в последующие дни (табл. 68). Это так называемый *физиологический лейкоцитоз*. У молодняка может встречаться *медикаментозный лейкоцитоз*, который развивается после парентерального введения вакцин, сывороток, белковых препаратов.

При многих инфекционных и неинфекционных болезнях развивается *реактивный лейкоцитоз*, причина которого — стимуляция лейкопоэтической функции костного мозга, лимфатических узлов и селезенки циркулирующими в крови продуктами распада тканевых белков и бактериальными токсинами. Он является защитной реакцией, изменения при этом временные и с улучшением состо-

68. Динамика морфологического состава крови у клинически здоровых телят (В. И. Головаха, 1995)

Показатель	Дни жизни					
	1-й	2-й	5-й	10-й	20-й	30-й
Эритроциты, Т/л	5,5—9,0	4,5—9,5	4,5—8,5	4,5—8,5	4,5—10,5	5,0—7,5
M ± m	7,2 ± 0,3	7,4 ± 0,42	6,5 ± 0,33	6,2 ± 0,32	6,1 ± 0,43	6,2 ± 0,24
Лейкоциты, Г/л	6,5—14,0	5,7—12,5	5,0—10,0	5,0—10,0	6,0—10,0	5,5—9,0
M ± m	9,3 ± 0,71	7,5 ± 0,5	7,5 ± 0,61	7,26 ± 0,41	8,6 ± 0,77	6,55 ± 0,23
Базофилы, %	0—1	0—1	0—1	0—1	0—1	0—1
Эозинофилы, %	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2
Палочкоядерные, %	27,0 ± 2,0 (16—40)	28,0 ± 3,0 (18—35)	27,0—2,0 (16—35)	20,0 ± 2,0 (18—36)	24,0 ±·2,0 (12—35)	19,0 ± 1,0 (6—28)
Сегментоядерные, %	28,0 ± 3,0 (11—48)	25,0 ± 5,0 (18—48)	11,0 ± 2,0 (5—18)	13,0 ± 2,0 (13—26)	11,0 ± 2,0 (15—24)	16,0 ± 2,0 (19—33)
Лимфоциты, %	45,0 ± 3,0 (30—68)	46,0 ± 5,0 (17—70)	62,0 ± 3,0 (54—75)	67,0 ± 3,0 (51—81)	65,0 ± 3,0 (58—83)	65,0 ± 3,0 (47—75)
Моноциты, %	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2

яния здоровья состав крови восстанавливается. Реактивный лейкоцитоз необходимо дифференцировать от *патологического*, при котором в крови появляются патологически измененные, морфологически и функционально незрелые формы лейкоцитов. Он развивается при структурных изменениях органов лейкопоэза.

Анализ лейкограммы телят показывает три характерные особенности: а) у телят до 3—5-дневного возраста — нейтрофильный профиль крови, а с 5-дневного превалирует лимфоцитарный; б) среди нейтрофилов до 20-дневного возраста превалирует количество палочкоядерных, а не сегментоядерных; в) в крови очень мало базофилов (0—1 %), эозинофилов (0—2 %) и моноцитов (0—2 %). Особенности лейкограммы жеребят представлены в таблице 69 [9].

69. Количество лейкоцитов и лейкограмма жеребят (В. И. Головаха, 2003)

Показатель	Возраст						
	1—5 дней	10 дней	20 дней	30 дней	3 мес	6 мес	12 мес
Лейкоциты, Г/л	5,4—11,0 8,0 ± ± 0,7	5,5—13,0 8,5 ± ± 0,9	6,0—14,5 9,5 ± ± 0,7	5,0—15,0 9,0 ± 0,6	5,5—12,0 9,0 ± 0,5	5,0—12,0 9,0 ± 0,5	6,0—12,5 10,0 ± 0,7
Базофилы	0—1	0—1	0—1	0—1	0—1	0—1	—

Продолжение табл. 69

Показатель	Возраст						
	1—5 дней	10 дней	20 дней	30 дней	3 мес	6 мес	12 мес
Эозинофилы	0—6 2,3 ± ± 0,4	1—13 3,0 ± ± 0,5	1—10 3,0 ± ± 0,5	1—9 4,0 ± 0,5	1—12 5,0 ± ± 1,3	1—9 5,5 ± 1,1	1—6 3,5 ± 0,7
Нейтрофилы:	2—12	4—16	3—19	2—17	2—10	2—10	4—13
палочкоядерные	8,0 ± 1,3	10,0 ± ± 0,8	8,5 ± ± 1,0	9,0 ± 0,9	6,5 ± ± 1,1	5,5 ± 1,4	8,0 ± 1,3
сегментоядерные	27—50 40,0 ± ± 2,0	25—55 44,0 ± ± 1,8	35—50 43,0 ± ± 1,7	22—50 39,0 ± ± 1,9	22—53 40,5 ± ± 2,0	25—40 32,0 ± ± 2,7	34—46 40,5 ± ± 1,7
Лимфоциты	33—60 49,5 ± ± 3,1	28—64 40,3 ± ± 1,8	23—52 45,0 ± ± 1,7	29—73 48,0 ± ± 1,9	36—68 47,0 ± ± 2,6	40—65 57,0 ± ± 4,0	40—60 48,0 ± ± 1,9
Моноциты	0—2	0—3	0—1	0—3	0—2	1—3	1—3

10.2. БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Количество общего белка у телят до первой выпойки молозива составляет 38—50 г/л, у телят в возрасте 1—10 дней — 56—70; у жеребят — 50—70; у поросят — 45—50; у ягнят — 46—54 г/л. В дальнейшем содержание общего белка увеличивается (табл. 70—73) и колеблется в пределах 55—65 г/л [6], а по данным некоторых авторов [8, 18, 36], в 3-месячном возрасте среднее содержание белка у телят составляет 71,5 ± 1,6 — 71,7 ± 13,0 г/л (см. табл. 71, 72).

70. Содержание общего белка и белковых фракций в сыворотке крови телят (В. И. Головаха, 1995)

Показатель	Дни жизни				
	1-й	2—3-й	5-й	20-й	30-й
Общий белок, г/л	38,2—52,6	42,0—76,3	54,2—69,4	50,0—71,1	50,7—67,7
M ± m	44,7 ± 1,5	57,9 ± 2,7	56,4 ± 1,9	58,0 ± 1,3	58,6 ± 1,1
Альбумины, г/л	15,2—26,7	13,5—38,6	19,4—33,8	21,5—38,7	29,4—42,6
M ± m	19,4 ± 2,1	25,0 ± 2,3	27,1 ± 3,1	30,0 ± 1,3	35,6 ± 1,0
α-Глобулины, г/л	2,4—7,8	2,31—10,7	1,36—7,4	2,9—12,6	3,1—10,4
M ± *m*	5,4 ± 1,6	5,4 ± 1,7	6,1 ± 1,4	7,8 ± 1,2	6,25 ± 0,5
β-Глобулины, г/л	4,6—24,2	4,07—29,9	4,71—17,4	5,8—22,5	6,0—14,8
M ± m	12,3 ± 1,3	13,4 ± 2,1	14,0 ± 3,3	12,2 ± 2,4	10,0 ± 0,6
γ-Глобулины, г/л	0,8—6,08	2,06—29,5	5,94—17,6	3,0—14,2	2,94—14,6
M ± m	3,3 ± 0,6	14,2 ± 2,7	12,2 ± 2,7	7,9 ± 1,9	6,8 ± 0,6
А/Г	0,92 ± 0,12	0,8 ± 0,17	0,84 ± 0,2	1,1 ± 0,4	1,5 ± 0,2

71. Состав белков сыворотки крови телят (Р. Б. Флюнт с соавт., 2002)

Возраст, дней	Общий белок, г/л	Альбумины, г/л	Глобулины, г/л					
			α_1	α_2	β_1	β_2	γ_1	γ_2
3	56,7 ± 1,1	24,6 ± 0,8	4,6 ± 0,07	7,1 ± 0,1	4,7 ± 0,03	8,5 ± 0,1	18,2 ± 0,3	0
30	66,4 ± 1,2	34,4 ± 0,9	4,7 ± 0,05	6,2 ± 0,1	4,6 ± 0,03	9,1 ± 0,1	9,3 ± 0,2	0
90	71,5 ± 1,6	31,5 ± 0,4	5,3 ± 0,04	6,1 ± 0,1	4,1 ± 0,03	8,7 ± 0,1	10,4 ± 0,3	5,2 ± ± 0,1

72. Состав белков сыворотки крови телят, г/л (О. М. Дацьків, 2002)

Показатель	Возраст, дней			
	1	7—8	30	90
Общий белок	56,9 ± 11,0	66,3 ± 12,0	65,0 ± 12,0	71,7 ± 13,0
Альбумины	24,1 ± 0,5	28,7 ± 0,8	34,2 ± 10,0	31,5 ± 10,0
Глобулины:				
α_1	6,5 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,4 ± 0,2	5,2 ± 0,2
α_2	5,2 ± 0,2	4,2 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,7 ± 0,2
β_1	4,5 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2
β_2	8,4 ± 0,4	8,1 ± 0,2	7,6 ± 0,3	7,9 ± 0,3
γ_1	8,2 ± 0,3	17,3 ± 0,3	9,6 ± 0,3	10,0 ± 0,4
γ_2	—	—	—	7,1 ± 0,2

73. Содержание белковых фракций в сыворотке крови телят и молодняка (Н. И. Блинов, 1985)

Возраст телят, дней	Фракции белков, г/л			
	альбумины	α-глобулины	β-глобулины	γ-глобулины
При рождении	21,0—25,0	12,0—16,0	5,0—7,0	1,0—3,0
1—5	19,0—25,0	11,0—15,0	7,0—13,0	6,0—20,0
6—10	19,0—25,0	10,0—12,0	9,0—13,0	4,0—16,0
11—15	22,0—26,0	8,0—12,0	7,0—11,0	3,0—13,0
16—25	23,0—29,0	8,0—10,0	8,0—12,0	5,0—13,0
26—35	28,0—30,0	8,0—10,0	8,0—12,0	6,0—12,0
36—45	27,0—29,0	8,0—10,0	8,0—10,0	6,0—12,0
120—240	29,0—33,0	8,0—10,0	6,0—12,0	6,0—12,0

Уменьшение содержания общего белка в сыворотке крови — *гипопротеинемия* — развивается при длительном дефиците протеина в рационе, недостаточном переваривании белка и всасывании аминокислот в кишечнике, нарушении синтеза белка в печени при ее патологии (цироз печени, реже гепатит), при потере белка вследствие патологии почек (нефроз, нефрит), кровотечениях, развитии обширных экссудатов и транссудатов, при нарушении синтеза иммуноглобулинов G. Гипопротеинемия чаще бывает вследствие уменьшения количества альбуминов (*гипоальбуминемия*).

Гиперпротеинемия — повышение количества белка в сыворотке крови — бывает *относительной* (вследствие сгущения крови при дегидратации) и *абсолютной*, которая всегда сопровождается увеличением содержания γ-глобулинов (встречается при хроническом течении гепатита, хронических инфекциях и воспалительных процессах, что значительно менее характерно для молодняка).

Нарушение оптимального соотношения между белковыми фракциями называется *диспротеинемией*. Наиболее выраженной диспротеинемия бывает при патологии органов, где синтезируются белки. Особенно часто уменьшается количество альбуминов — гипоальбуминемия, которая развивается при болезнях печени (гепатит, гепатоз, абсцессы), а также при различных болезнях, при которых патология печени развивается вторично (пневмония), патологии почек.

Динамика отдельных фракций белков сыворотки крови телят представлена в таблицах 70—73а уровня общего белка в сыворотке крови жеребят приведена в таблице 74.

74. Содержание общего белка и альбуминов у жеребят украинской верховой породы (В. И. Головаха, 2003)

Возраст	Общий белок, г/л	Альбумины	
		г/л	%
1-й день	46,0—62,0	23,0—42,5	34,0—71,0
M ± m	57,0 ± 1,4	31,0 ± 2,2	59,0 ± 4,7
10 дней	44,0—72,0	21,0—39,5	37,0—69,0
M ± m	58,5 ± 1,7	30,0 ± 1,7	49,0 ± 2,0
20 дней	47,5—68,0	23,0—42,5	33,0—72,5
M ± m	59,5 ± 1,2	31,0 ± 1,9	51,0 ± 2,6
30 дней	44,0—71,0	20—40,0	31,0—68,0
M ± m	59,5 ± 1,2	28,0 ± 1,2	48,0 ± 1,8
3 мес	41,0—79,0	20,0—37,0	32,0—56,5
M ± m	63,0 ± 1,5	26,0 ± 1,2	43,0 ± 1,4
6 мес	48,0—75,0	20,0—30,0	34,0—51,0
M ± m	62,0 ± 1,7	23,0 ± 0,8	41,0 ± 1,8
9 мес	48,0—65,0	20,0—34,0	36,7—56,0
M ± m	58,0 ± 1,3	28,0 ± 1,6	48,0 ± 2,2
12 мес	62,0—72,0	26,0—38,4	42,0—56,5
M ± m	66,5 ± 1,0	35,0 ± 1,4	53,0 ± 1,5

Содержание альбуминов у телят после рождения до первой выпойки молозива составляет 19,4 ± 2,1 г/л, у однодневных — 24,1 ± 0,6 (42 % общего количества), у 3-дневных — 25,0 ± 2,3 (44,1 %), у 5-дневных — 27,0 ± 3,1, у 7—8-дневных — 28,7 ± 0,9 г/л (43,3 %), остается стабильным до 20-дневного возраста и лишь в месячном возрасте количество альбуминов возрастает до 35,6 ± 1,0 г/л, в 3-месячном — 31,5 ± 0,4 г/л (44,1 %) (см. табл. 70) [6].

Более полные сведения получены при электрофорезе белков в полиакриламидном геле [16]. Количество альбуминов в сыворотке крови телят 1—3-месячного возраста колеблется в пределах 20,0—38,0 (28,0 ± 1,2) г/л, или 44,1 ± 1,26 % от общего белка (табл. 75). Кроме альбуминов к мелкодисперсным белкам относятся преальбумины (их содержание составляет 0,7—1,6 г/л).

75. Содержание белковых фракций в сыворотке крови телят 1—3-месячного возраста, г/л (Н. В. Козий, 2003)

Фракция белков	Содержание
S-фракция	1,6—4,0 (2,56 ± 0,19)
Ig A	4,0—8,5 (5,64 ± 0,27)
Ig G	8,0—17,0 (11,8 ± 0,5)
Гаптоглобин	1,5—6,0 (3,1 ± 0,30)
Трансферин	2,0—7,5 (4,6 ± 0,42)
Церулоплазмин	1,2—2,0 (1,6 ± 0,06)
Постальбумины	2,5—8,5 (5,0 ± 0,40)
Альбумины	20,0—38,0 (28,0 ± 1,12)
Преальбумины	0,7—1,5 (1,0 ± 0,06)

Фракция α-глобулинов включает две подфракции — α_1- и α_2-глобулины. Количество их определяется суммарно или раздельно (см. табл. 70—72). Суммарное среднее содержание α_1- и α_2-глобулинов, по данным разных авторов [8, 18, 36], почти не отличается. α-Глобулины называются еще белками «острой фазы», потому что количество их возрастает при острых воспалительных процессах. В эту фракцию относятся С-реактивный белок (в норме его количество составляет 0—10 мг/л), церулоплазмин, гаптоглобин, α_1-антитрипсин, α_2-макроглобулин. Содержание некоторых из этих белков приведено в таблице 75 [16].

Церулоплазмин является поздним белком острой фазы воспаления. Он катализирует окисление Fe^{2+} до Fe^{3+}. Содержание церулоплазмина у телят 1—3-месячного возраста составляет 1,2—2,0 (1,6 ± 0,06) г/л, у больных бронхопневмонией телят количество его увеличивается (Козий Н. В., 2003).

α_1-Антитрипсин (ААТ) — ингибитор протеиназ. Он обеспечивает почти 90 % антитрипсиновой активности сыворотки крови, ингибирует функции эластазы, которая выделяется сегментоядерными нейтрофилами при фагоцитозе. Среднее количество ААТ в сыворотке крови телят составляет 85,9 ± 2,39 мкмоль/л, а у больных бронхопневмонией — 77,3 ± 2,65 мкмоль/л [16].

α_2-Макроглобулин (AMG) — ингибитор таких протеиназ, как трипсин, химотрипсин, тромбин, плазмин и каликреин. Протеиназы связываются с AMG, и в течение нескольких минут комплекс элиминируется из плазмы крови. Содержание AMG в сыворотке крови телят составляет 3,0 ± 0,2 г/л [16].

Гаптоглобин (HAP) связывает гемоглобин, освобождающийся при гемолизе. Содержание его в сыворотке крови телят, по данным Н. В. Козий, составляет 1,1—6,0 (3,1 ± 0,30) г/л, по данным И. М. Карпутя — 1,8 ± 0,1 г/л. У больных бронхопневмонией его количество увеличивается.

Трансферин (TRF) принадлежит к β-глобулинам и выполняет функцию основного белка, транспортирующего железо до костного мозга. Синтезируется преимущественно в печени. Содержание в сыворотке крови телят составляет 2,0—7,5 (4,6 ± 0,42) г/л [**16**], по данным И. М. Карпутя [**29**], — 3,7 ± 0,3 г/л. Увеличивается при бронхопневмонии телят и дефиците железа.

Фракция β-глобулинов при электрофорезе в агаровом геле подразделяется на две подфракции — β_1- и β_2-глобулины, суммарное среднее содержание которых по различным источникам в течение первых 3 мес жизни мало отличается (см. табл. 71—73).

Фракция γ-глобулинов содержит основное количество иммуноглобулинов, уровень которых определяется морфологической зрелостью и функциональной полноценностью иммунореактивной ткани. Низкий уровень γ-глобулинов отмечают у новорожденных телят, особенно в первый день жизни: по данным В. И. Головахи [**6**], он равен 0,8—6,0 (3,3 ± 0,6) г/л и составляет лишь 8,2 % общего белка. На 2—3-й дни количество γ-глобулинов увеличивается в 3 раза и составляет почти 1/4 общего белка. Поддерживается этот уровень в первую декаду жизни. На 20—30-й дни жизни телят их содержание уменьшается по сравнению с 10-дневными, а к 3-месячному возрасту начинают синтезироваться γ-глобулины, поэтому общее количество их возрастает (см. табл. 71—73).

10.3. ОСОБЕННОСТИ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ИММУННОЙ РЕАКТИВНОСТИ МОЛОДНЯКА

Устойчивость организма к заболеваниям зависит от состояния естественной резистентности и иммунной реактивности. Резистентность — это состояние защитных и приспособительных механизмов организма, способных противостоять различным неблагоприятным факторам окружающей среды, т. е. вирусам, бактериям, простейшим. Резистентность условно разделяют на неспецифическую и специфическую (иммунитет). Неспецифическая — это общая естественная наследственная устойчивость организма. Она определяется состоянием кожных покровов и слизистых барьеров, наличием бактерицидных субстанций в кожных складках; факторами, которые обеспечивают гомеостаз организма; кислотностью желудочного сока; активностью пищеварительных ферментов; фагоцитозом микро- и макрофагов; наличием в крови и других жидкостях организма комплемента, лизоцима, пропердина, интерферона и других ингибиторов; постоянностью микрофлоры и уровня белка.

Специфическая резистентность — это невосприимчивость организма против возбудителей инфекционных и паразитарных болезней или токсинов [38]. Устойчивость животных к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе и к возбудителям инфекционных болезней, обусловлена комплексом неспецифических и специфических защитных факторов. Естественные факторы резистентности филогенетически появились раньше, позже возникли специфические факторы защиты. Такая же последовательность формирования резистентности имеет место и в онтогенезе.

Резистентность животных обусловлена их реактивностью, которая характеризуется способностью организма отвечать соответствующими реакциями на действие факторов окружающей среды. В основе специфической резистентности лежит иммунная реактивность, т. е. ответная реакция организма на действие специфических антигенов (микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности).

Иммунная реактивность обеспечивается функцией иммунной системы, основной задачей которой является распознавание, взаимодействие и удаление из организма чужеродных клеток и других субстанций, которые проникли из внешней среды или образовались в организме вследствие мутагенеза или патологического процесса в клетках и тканях [38].

К центральным органам иммуногенеза у млекопитающих относится костный мозг, тимус, а у кур — тимус и фабрициева сумка.

У телят закладка тимуса происходит на 6—7-й неделях гестации, в тимусе 3-месячного плода четко разграничиваются кора и мозговая часть, к концу 3-го месяца завершается образование телец Гассаля. У 2,5—3-месячного плода селезенка, костный мозг и лимфатические узлы интенсивно заселяются лимфоцитами [25, 26]. Первые лимфоциты в периферической крови появляются на 2-м месяце гестации, Т-лимфоциты способны распознавать чужеродные антигены на 4-м месяце гестации с появлением на их мембране молекул антигенов гистосовместимости (BoLA).

Естественные килеры (ЛК-клетки) появляются в крови плода на 3-м месяце гестации, но их функциональная активность низкая и недостаточная для элиминации клеток, инфицированных вирусом или другими возбудителями инфекций. Активность цитотоксичных Т-лимфоцитов также низкая и в крови новорожденных телят не превышает 50 % активности взрослых животных [33].

Зрелые В-лимфоциты в периферической крови плода крупного рогатого скота появляются на 3-м месяце гестации, после 3-го месяца они способны трансформироваться в плазматические клетки, но концентрация IgM — наиболее древнего в эволюционном аспекте иммуноглобулина и появляющегося первым после введения антигенов — в конце 4-го месяца гестации составляет примерно 0,1 г/л, а в конце стельности — 0,4 г/л. Примерно на таком же уровне в неонатальный период содержание IgG—основного защитного белка [26].

Иммунная система плода при его контакте с чужеродными антигенами отвечает увеличенным синтезом IgM, поэтому повышенный уровень его в крови новорожденных свидетельствует об антигенной стимуляции плода или об его внутриутробном инфицировании. Таким образом, у сельскохозяйственных животных лишь незначительное количество иммуноглобулинов может синтезироваться собственной лимфоидной тканью или передаваться через плаценту. Основную массу их новорожденные получают с материнским молозивом.

Трансэпителиальный переход IgG из крови матери в секрет молочной железы в конце беременности, а затем с молозивом — в кровь телят в первые 24—36 ч жизни осуществляется селективно с помощью рецепторного механизма. Молекула IgG_1 связывается с рецептором к Fc-фрагменту на поверхности эпителия молочной железы и подвергается пиноцитозу, затем переходит в секрет вымени. Подобный механизм транспортировки IgG_2 и IgM у коров не выявлен [27].

Аналогично рассматривается механизм транспорта иммуноглобулинов из молозива через эпителий тонкого кишечника в кровоток теленка. Иммуноглобулины на поверхности энтероцита связываются с помощью Fc-фрагмента собственной молекулы с белковым рецептором апикальной мембраны, образуя комплекс Ig-рецептор. Вследствие интенсивных процессов пиноцитоза у новорожденных животных, которые обусловлены, в том числе, низкой вязкостью плазматической мембраны, комплекс Ig-рецептор транспортируется через энтероциты в кровь теленка в составе эндоцитозного пузырька или самостоятельно [27].

Интенсивность усвоения иммуноглобулинов и напряженность колострального иммунитета зависят от качества молозива (кислотности, концентрации белка, иммуноглобулинов, количества лейкоцитов, активности ингибитора и блокатора трипсина, температуры молозива), своевременной выпойки молозива, способа выпойки, состояния энтероцитов и кислотно-щелочного баланса у новорожденных, температуры внешней среды и т. д. [39]. Абсорбируются иммуноглобулины быстро. Если теленок получил молозиво в первые 1—2 ч жизни, то в сыворотке крови иммуноглобулины появляются через 2—3 ч, а максимальное содержание их устанавливают через 16—18 ч, IgM — через 24—48 ч, IgA — 48 ч.

Спустя 8 ч после рождения интенсивность резорбции иммуноглобулинов уменьшается в 2 раза, у некоторых животных и вовсе прекращается через 12 ч, а в отдельных случаях — даже через 4—6 ч после рождения. Количество абсорбированных иммуноглобулинов в значительной степени определяет уровень постнатального формирования и функционирования иммунной системы.

Полученные новорожденными животными колостральные иммуноглобулины представляют собой антитела к антигенам, встречающимся в окружающей среде и возникающим эндогенно, а так-

же к антигенам, которыми иммунизировались матери. Период полураспада IgM у телят и поросят составляет 3—5 дней, IgA — 4—6, IgG — 10—14 дней. Из-за распада иммуноглобулинов уровень колостральных антител начинает постепенно снижаться [29].

После рождения организм молодняка подвергается антигенной стимуляции через кожу, дыхательные и пищеварительные пути вследствие заселения их микроорганизмами. Это стимулирует развитие лимфоидной системы: происходит заселение лимфоцитами периферических лимфоузлов, особенно мезентериальных, увеличивается их масса, интенсивно развиваются центры размножения и формирования плазматических клеток.

В первые дни жизни увеличивается абсолютное количество лимфоцитов, в том числе Т-лимфоцитов, хотя относительное количество лимфоцитов, которые образуют розетки с эритроцитами овцы (Е-РОК), у новорожденных телят меньше, чем у взрослых животных. Поэтому считается, что Т-система иммунитета полностью сформирована в неонатальный период жизни телят. Способность Т-лимфоцитов к сенсибилизации с последующим ответом на митогенную стимуляцию у новорожденных животных не ниже, чем у взрослых [37].

В первую неделю жизни телят относительное количество $CD4^+$-Т-хелперных клеток составляет 44,2 ± 1,3 %, $CD8^+$-Т-супрессорных — 29,8 ± 1,4, В-лимфоцитов — 14,8 ± 0,9 % [33].

Количество В-лимфоцитов в крови новорожденных телят больше, чем у взрослых животных, но их функциональная активность ограничена. Они характеризуются низкой чувствительностью к интерлейкинам, которые синтезируются Т-хелперами, и в первые 20 дней жизни не реагируют на специфические антигены пролиферацией и увеличением синтеза антител. Такое состояние иммунитета у телят и поросят раннего возраста определено как временный иммунодефицит [37].

Уровень иммуноглобулинов и связанных с ними специфических антител — наиболее важный и решающий механизм защиты организма в течение индивидуального развития. В многочисленных исследованиях показано, что содержание их в крови зависит от возраста животных. Наиболее выражены эти изменения в течение первых дней и недель после рождения. У новорожденных телят до первой выпойки молозива общее количество иммуноглобулинов в сыворотке крови, определяемое по реакции с 18%-ным раствором безводного натрия сульфита, составляет 1,5—5 (2,28 ± ± 0,39) мг/мл, в том числе количество IgG (по методу Манчини) — 1,33 ± 0,25 мг/мл. У многих телят IgG вообще не обнаруживается (табл. 76 и 77). Еще меньшее количество иммуноглобулинов отдельных классов установлено Р. П. Маслянко (табл. 78). После двух-трех выпоек молозива содержание иммуноглобулинов увеличивается: IgG до 11,2 ± 1,8 мг/мл, IgM — 2,08 ± 0,3 мг/мл (см. табл. 77), на 3-й день жизни количество IgG составляет 15,0 ± 0,54 мг/мл (см.

76. Некоторые показатели естественной резистентности у телят раннего возраста (В. М. Безух, 1998)

Возраст, дней	Общее количество Ig, мг/мл	IgG, мг/мл	IgM, мг/мл	БАСК, %
До выпойки молозива	3,5—5,0	—	—	23,9 ± 1,7
3	22,5 ± 0,70	15,0 ± 0,54	2,7 ± 0,09	57,6 ± 2,3
6	19,9 ± 0,90	13,5 ± 0,40	2,5 ± 0,05	54,8 ± 2,0
10	18,4 ± 0,50	12,3 ± 0,17	2,3 ± 0,06	53,7 ± 2,5

Примечание. БАСК — бактерицидная активность сыворотки крови.

77. Содержание общего количества иммуноглобулинов и их классов в сыворотке крови телят, мг/мл (В. И. Головаха, 1995)

Показатель	Дни жизни					
	1-й	2—3-й	5-й	10-й	20-й	30-й
Иммуноглобулины,	11,4—25,8	6,4—28,0	6,5—22,3	4,39—21,2	4,3—13,4	4,6—10,7
M ± m	17,2 ± 1,3	16,1 ± 2,9	13,3 ± 1,0	11,3 ± 1,4	7,8 ± 1,0	8,2 ± 0,5
Иммуноглобулины, *G*,	9,0—14,4	3,9—14,1	4,1—13,5	4,1—13,8	4,8—13,2	5,5—14,1
M ± m	11,2 ± 1,8	6,8 ± 1,8	9,0 ± 1,7	9,7 ± 2,2	9,1 ± 1,6	10,3 ± 1,35
Иммуноглобулины, *M*,	1,2—2,5	1,0—2,4	1,0—2,4	1,1—2,2	1,0—2,5	1,8—2,2
M ± m	2,08 ± 0,3	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,3	1,66 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1

78. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови телят, мг/мл (Р. П. Маслянко, 1999)

Возраст	Общее количество	IgG_1	IgG_2	IgM	IgA
До выпойки молозива	0,05—0,65	0,05—0,63	0,01	0,17	0,01
10—24 ч	2,0—21,7	1,20—20,1	0,8	1,5—4,7	0,5—5,4
3—9 дней	5,3—20,2	4,3—18,7	0,9—1,5	1,1—3,5	0,5—2,3
3 нед	13,96	12,86	1,11	1,94	0,32

табл. 76) и даже 18,2 ± 0,3 мг/мл (см. табл. 71). Этот уровень поддерживается примерно до 5—7-го дня жизни, а затем постепенно уменьшается. В трехмесячном возрасте организм телят синтезирует IgG_2, концентрация его быстро достигает уровня, характерного для взрослых животных. Количество IgG у телят 2—3-месячного возраста составляет 8,0—17,0 (11,8 ± 0,5) мг/мл, IgA — 4,0—8,5 (5,6 ± ± 0,27) мг/мл **[16]**.

Подобная динамика изменений содержания иммуноглобулинов в период онтогенеза отмечается у ягнят (табл. 79). В молозиве овцематок содержится в 3 раза больше IgG, чем в молозиве коров.

У свиней выявлено три основных класса иммуноглобулинов. Динамика их приведена в таблицах 80 и 81 **[26]**.

79. Содержание иммуноглобулинов в сыворотке крови ягнят, мг/мл (Ю. Н. Федоров, 1985)

Возраст	Общее количество	IgG_1	IgG_2	IgM	IgA
До выпойки молозива	0,43	0,04	—	0,26	0,13
2 дня	12,3—26,8	12,3—26,1	0,66	1,38—2,2	0,26—0,7
16 дней	8,37	8,30	0,07	0,50	
2 мес	5,52	5,06	0,46	1,14	0,06
4 мес	11,24	9,42	1,82	1,75	0,11

80. Содержание иммуноглобулинов у поросят, мг/мл (T. M. Setcvage, T. B. Kim, 1976; T. Yabiki et al., 1974)

Возраст	IgG	IgM	IgA
1 день	20,4—26,3	1,02—2,9	2,62—9,1
1 мес	5,1—6,7	0,86—1,5	0,20—1,05
Взрослые животные	18,3—19,5	3,15—3,19	1,44—2,68

81. Иммунологические показатели крови поросят (М. Г. Николадзе, 2002)

Показатель	Возраст, дней				
	2—4	9—11	16—18	24—28	30—32
Лимфоциты, 10^9/л	3,96 ± 0,12	4,10 ± 0,17	4,29 ± 0,11	4,84 ± 0,22	4,76 ± 0,28
Т-лимфоциты, 10^9/л	2,16 ± 0,14	2,58 ± 0,19	2,62 ± 0,19	2,81 ± 0,16	4,89 ± 0,20
В-лимфоциты, 10^9/л	0,44 ± 0,04	0,54 ± 0,07	0,67 ± 0,08	0,63 ± 0,09	0,71 ± 0,11
Общий белок, г/л	65,2 ± 2,52	72,1 ± 4,14	65,9 ± 3,55	75,6 ± 3,82	70,4 ± 3,51
Иммуноглобулины G + A, г/л	22,9 ± 1,76	17,6 ± 1,14	13,71 ± 0,97	10,8 ± 0,34	10,4 ± 0,47
Иммуноглобулины M, г/л	1,96 ± 0,32	2,14 ± 0,38	2,19 ± 0,60	2,98 ± 0,42	2,67 ± 0,54

При исследовании лошадей в сыворотке крови и молозиве кроме трех основных классов иммуноглобулинов идентифицирован еще и Т-белок, который передвигается в электрическом поле в зоне γ_2-иммуноглобулинов. В первом молозиве он не идентифицируется.

В сыворотке крови жеребят в первые 16 дней жизни не идентифицирован IgA, несмотря на наличие его в молозиве. Возрастные изменения уровня иммуноглобулинов у жеребят приведены в таблице 82. Молозиво кобыл характеризуется резким уменьшением концентрации IgG в первый день после родов (в 40 раз).

Наибольшее количество изотипов иммуноглобулинов обнаружено в сыворотке крови собак (табл. 83).

82. Содержание иммуноглобулинов у жеребят, мг/мл (C. W. Kohn et al., 1989; J. K. M. Lin, 1991)

Возраст	IgG	IgG (T)	IgM	IgA
Новорожденные	0—0,16	0	0,2—0,3	0
16 дней	5,3—13	1,2—1,8	0,2—0,4	—
6 мес	6,7	7,05	4,2	0,95

83. Содержание иммуноглобулинов у собак, мг/мл (M. J. Day, W. J. Penhale, 1988; H. Y. Reynolds, J. S. Jonson, 1970)

Возраст	IgG_1	IgG_2	IgG_3	IgM	IgA
6—12 мес	1,4—3,7	1,6—5,0	0,4—1,2	1,2—1,7	0,3—0,6
1—2 года	0,9—4,0	1,2—5,9	0,2—1,4	1,3—1,4	0,4—1,1
3—4 года	0,7—3,2	0,9—6,0	0,3—1,6	0,3—1,5	0,4—1,3

84. Некоторые показатели клеточного и гуморального иммунитета у телят черно-пестрой породы (Р. И. Кравцив с соавт., 2003)

Показатель	Возраст			
	1 день	1 мес	3 мес	6 мес
Общее количество лимфоцитов, г/л	4,5 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,2 ± 0,3	4,9 ± 0,2
Т-лимфоциты, %	63,4 ± 2,7	60,1 ± 3,5	59,3 ± 3,1	58,9 ± 3,7
В-лимфоциты, %	21,7 ± 1,4	28,4 ± 1,7	31,9 ± 1,5	32,6 ± 1,3
Фагоцитарная активность лейкоцитов, %	45,1 ± 2,3	51,9 ± 1,8	53,7 ± 2,6	54,2 ± 1,9
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	33,8 ± 1,7	55,1 ± 2,6	68,4 ± 2,1	69,3 ± 2,4
Лизоцимная активность сыворотки крови, %	24,7 ± 1,5	25,2 ± 1,6	26,1 ± 1,7	28,6 ± 1,7
Комплементарная активность сыворотки, ед.	2,1 ± 0,3	6,9 ± 0,7	9,7 ± 1,1	11,8 ± 0,6

85. Показатели фагоцитарной активности крови поросят (М. Г. Николадзе, 2002)

Показатель	Возраст, дней				
	2—4	9—11	16—18	24—28	30—32
Нейтрофилы, 10^9/л	2,64 ± 0,15	3,04 ± 0,16	2,87 ± 0,14	3,02 ± 0,15	2,97 ± 0,18
Моноциты, 10^9/л	0,15 ± 0,011	0,20 ± 0,014	0,21 ± 0,013	0,20 ± 0,013	0,28 ± 0,017
Фагоцитоз, %	47,6 ± 0,83	42,6 ± 1,71	49,0 ± 1,28	55,2 ± 3,28	56,0 ± 2,64
Фагоцитарное число	5,35 ± 0,27	6,00 ± 0,41	5,94 ± 0,41	4,20 ± 0,45	4,82 ± 0,28
Фагоцитарный индекс	2,55 ± 0,17	2,56 ± 0,19	2,91 ± 0,22	2,32 ± 0,19	2,70 ± 0,20
ЭСК, 10^9 микробов/л	4,72 ± 0,46	5,38 ± 0,62	5,85 ± 0,66	4,34 ± 0,43	3,78 ± 0,54

У них четко идентифицированы три подкласса иммуноглобулинов G: IgG_1; IgG_2 и IgG_3, концентрация которых существенно не изменяется в течение постнатального онтогенеза.

Динамика некоторых показателей клеточного и гуморального иммунитета у телят и поросят представлена в таблицах 76, 84 и 85.

10.4. ДИНАМИКА ВОЗРАСТНЫХ ИММУННЫХ ДЕФИЦИТОВ

Иммунные дефициты по происхождению бывают врожденные (первичные), возрастные (физиологические) и приобретенные (вторичные) [12]. Среди врожденных иммунных дефицитов у животных выделяют комбинированный иммунодефицит у арабских жеребят, сцепленный с Х-хромосомой комбинированный иммунодефицит у собак, летальный признак А-46 у черно-пестрого датского скота и голштинов, летальный акродерматит и гипоплазия тимуса у собак, болезнь Чедиака-Хигаши. Эти дефициты в ветеринарной медицине еще не нашли достаточного освещения в связи со сложностями их распознавания [35].

Вторичные иммунные дефициты развиваются у животных в результате воздействия очень многих факторов, основными из которых являются неполноценное кормление и тяжелое переболевание незаразными, инфекционными и другими болезнями, вследствие которых происходят потеря факторов иммунной защиты, функциональные или структурные (болезнь Гамборо, лейкоз) изменения органов иммуногенеза. Иммунная недостаточность усугубляет болезнь.

Наиболее актуальной является проблема возрастных иммунных дефицитов, в особенности в неонатальный и в молочный периоды жизни молодняка. Первый возрастной иммунный дефицит связан с недостаточным или несвоевременным поступлением с молозивом защитных факторов, недостаточным количеством выпаиваемого молозива или низким качеством его (содержание иммуноглобулинов меньше 50 г/л), что наблюдается при неполноценном кормлении матерей, недостаточным усвоением иммуноглобулинов вследствие морфофункциональной незрелости новорожденных, их переохлаждения, выпаивания молозива от коров, больных маститом, или холодного. В суточном возрасте у телят, подвергнутых холодовому стрессу, уровень общих иммуноглобулинов уменьшается в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой [17]. Первый возрастной иммунодефицит проявляется выраженной гуморальной иммунной и слабее клеточной недостаточностью. На его фоне возникают заболевания с диарейным, реже септическим синдромами, которые осложняются приобретенным иммунным дефицитом, развивающимся вследствие потери защитных факторов и структурно-функциональных изменений в иммунной системе.

Второй возрастной иммунный дефицит отмечают у телят и ягнят на 7—14-й день, у поросят — на 14—21-й, у цыплят — в

21—24- дневном возрасте. Он обусловлен распадом колостральных иммуноглобулинов и незрелостью иммунной системы молодняка, поэтому синтез гуморальных антител начинается лишь с 5—10-дневного возраста у телят и с 7—14-дневного у поросят, но проходит он на низком уровне. Развитие второй фазы иммунодефицита начинается с резкого снижения содержания иммуноглобулинов, особенно класса М, а затем IgG и в меньшей степени IgA. Вначале гуморальная иммунная недостаточность компенсируется усилением клеточных факторов защиты — в крови увеличивается количество лимфоцитов, тимусных лейкоцитов и фагоцитарная активность микрофагов. Затем происходит достоверное снижение гуморальных и клеточных факторов защиты. Следствием второго возрастного иммунодефицита являются повторные желудочно-кишечные и респираторные болезни, реже септический и кожный синдромы.

Третий возрастной иммунодефицит у поросят развивается при отъеме от свиноматок, у телят — при переходе с кормления молоком на растительные корма, у цыплят — в 2-месячном возрасте. Сопровождается эта фаза такими болезнями, как колиэнтеротоксемия, гастроэнтерит, кормовая аллергия, сальмонеллез, пневмония [11].

В основу иммунологической оценки синдромов иммунной недостаточности положены показатели общего иммунологического анализа крови [34]. В таблице 86 приведены его мини-нормы с целью диагностики трех (1, 2 и 3) возрастных иммунных дефицитов у телят и поросят.

86. Мини-норма показателей общего иммунологического анализа крови при возрастных иммунных дефицитах (В. А. Телепнев, 1998)

Показатель	Телята			Поросята		
	1	2	3	1	2	3
Количество лейкоцитов, Г/л	6,0	5,0	6,0	7,0	9,0	15,0
Относительное количество лимфоцитов, %	20	23	33	40	45	50
Абсолютное количество лимфоцитов, Г/л	4,0	4,0	4,5	3,5	4,5	8,5
Абсолютное количество Т-лимфоцитов, Г/л	2,8	2,7	2,8	2,5	3,5	7,5
Абсолютное количество В-лимфоцитов, Г/л	0,3	0,45	0,5	1,0	0,6	1,0
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	54	65	63	26	29	24
Концентрация иммуноглобулинов, г/л	15	8	12	25	7	7

В районных и областных лабораториях ветеринарной медицины чаще для диагностики иммунодефицитов определяют общее количество иммуноглобулинов реакциями с 18%-ным раствором безводного натрия сульфита или с цинка сульфатом и общий белок. Оптимальное количество иммуноглобулинов в сыворотке крови телят 20—30 г/л, общего белка 60—70 г/л.

10.5. КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОЙ БАЛАНС У НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

В норме телята рождаются в состоянии респираторно-метаболического ацидоза, который является физиологическим в течение первых часов жизни и патологическим, если ацидемия продолжается более 36 ч. До первого приема молозива показатели кислотно-щелочного баланса характеризуются низким значением pH крови (7,26—7,36), повышенным парциальным давлением углекислоты (48,0—56,0, иногда 60,0 мм рт. ст.), уменьшенным количеством бикарбонатов (20,0—30,0 ммоль/л) и дефицитом буферных оснований (колебания от −4,0 до 1,0 ммоль/л). Характер ацидемии у телят обусловлен прежде всего особенностями метаболических процессов во время внутриутробного периода развития и длительностью родов **[22, 24]**.

Первое дыхание новорожденного животного включает в работу малый круг кровообращения, что существенным образом в течение нескольких дней изменяет кислотно-щелочной баланс крови. Если в первые часы после рождения парциальное давление углекислоты (pCO_2) составляет 7,73 ± 1,05 кПа (58,1 ± 7,9 мм рт. ст.), а кислорода (pO_2) — 3,37 ± 0,49 кПа (25,3 ± 3,68 мм рт. ст.), то у телят 2—10-дневного возраста соответственно 6,04 ± 0,5 (4,45—8,8) и 5,05 ± 0,17 (4,25—5,54) кПа, т. е. 45,4 ± 3,76 (33,5—66,2) и 38,0 ± ± 1,28 (32,0—41,7) мм рт. ст. Уменьшение pCO_2 сопровождается повышением водородного показателя до 7,24—7,43, в среднем — 7,33 ± 0,026 (в первые часы жизни — 7,24 ± 0,79). Количество истинного (HCO_3^-) и стандартного (SB) гидрокарбоната крови в первые дни жизни возрастает соответственно до 25,1 ± 0,9 и 24,0 ± ± 0,6 ммоль/л, а дефицит буферных оснований составляет (−)2,7 + + 2,2 ммоль/л, в то время, как в первые дни от (−)8,0 + 1,0 ммоль/л **[22, 24]**. Более подробная динамика показателей кислотно-щелочного равновесия в первые дни жизни телят приведена Т. В. Любецкой (табл. 87).

87. Показатели кислотно-щелочного состояния крови телят в неонатальный период (Т. В. Любецкая, 2000)

Показатель	Время после рождения				
	1 ч	24 ч	48 ч	72—96 ч	20 сут
pH	7,3 ± 0,01	7,41 ± 0,01	7,40 ± 0,01	7,42 ± 0,01	
HCO_3^-, ммоль/л	26,2 ± 0,89	30,9 ± 0,75	33,0 ± 1,08	31,8 ± 1,40	39,4
pCO_2, мм рт. ст.	52,4 ± 1,749	48,7 ± 1,25	49,7 ± 1,11	54,3 ± 2,1	54,5 ± 1,46
СБО, ммоль/л	0,4	6,76	5,25	(−) 8,83 ± 0,82	(−) 11,3 ± 0,93

В условиях нарушения технологии кормления и содержания коров в период сухостоя телята часто рождаются с pH крови 7,15—7,20 и средним уровнем бикарбонатов в ней 17 ммоль/л. Это свидетельствует о значительном дефиците щелочного резерва, что подтверждается отрицательным значением сдвига буферных оснований [СБО около (−)8,0]. Кроме того, отрицательное влияние на показатели кислотно-щелочного состояния крови неонатальных телят оказывает бóльшая продолжительность течения отела коров и оказание помощи при отеле. Если отел коров продолжается около 10 ч, то pH крови телят уменьшается до 6,9—6,7, что становится опасным для их жизни.

Компенсация респираторно-метаболического ацидоза у телят происходит в течение первых 24 ч жизни благодаря различным механизмам. Уменьшение парциального давления CO_2 (pCO_2) крови сопряжено со становлением функции легких, а концентрация бикарбонатов увеличивается вследствие интенсивного поступления в организм щелочных эквивалентов с молозивом.

У телят, родившихся от коров с компенсированным или субкомпенсированным ацидозом, нормализация кислотно-щелочного баланса крови требует более длительного времени. Такие животные более склонны к острым желудочно-кишечным болезням в ранний неонатальный период жизни, ибо ацидемия (pH крови 7,30—7,33 по сравнению с 7,39—7,41 у здоровых) в течение первых 36 ч жизни угнетает интенсивность всасывания иммуноглобулинов из кишечника в среднем на 23 % **[23]**.

Кислотно-щелочное равновесие у новорожденных телят, больных диспепсией и колибактериозом, характеризуется развитием метаболического ацидоза. Величина pH крови уменьшается при средней тяжести болезни до 7,28 ± 0,01, при тяжелом течении — до 7,12 ± 0,03 (у клинически здоровых — 7,41—7,46). Концентрация бикарбонатов (HCO_3^-) уменьшается с 37,6 ± 0,9 до 20,9 ± 0,6 и даже 11,4 ± 0,9 ммоль/л, буферных оснований — в 2—2,5 раза. Сдвиг буферных оснований при тяжелом течении эшерихиоза составляет (−)5,7 ± 0,62, а при ассоциированной инфекции (эшерихиоз, рота- и коронавирусные энтериты) (−)17,7 ± 1,7 ммоль/л, у 30 % телят СБО в пределах от (−)18 до (−)30 ммоль/л. Уменьшается pCO_2 до 33,2 ± 0,9 мм рт. ст. по сравнению с 52,3 ± 2,4 у здоровых телят **[23]**.

10.6. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ У МОЛОДНЯКА

Интегрирующим показателем обмена углеводов служит содержание глюкозы в крови, количество которой у 10—20-дневных телят колеблется в пределах 2,2—4,2 ммоль/л **[6]**. У жеребят в течение первого года жизни уровень глюкозы постепенно уменьшается, стабилизируясь в 9-месячном возрасте **[17]**.

88. Содержание билирубина и мочевины в сыворотке крови телят (В. И. Головаха, 1995)

Показатель	День жизни					
	1-й	2—3-й	5-й	10-й	20-й	30-й
Билирубин, мкмоль/л	1,2—4,2	2,1—9,0	0,4—4,8	1,7—5,0	1,19—3,6	1,19—2,4
M ± m	2,4 ± 0,4	4,8 ± 0,7	3,1 ± 0,3	2,7 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3
Мочевина, мкмоль/л	1,3—5,0	2,9—7,2	4,4—7,3	4,7—8,0	3,8—6,6	4,2—6,8
M ± m	3,5 ± 0,34	5,97 ± 0,5	5,8 ± 0,4	6,4 ± 0,4	5,4 ± 0,3	4,7 ± 0,2

Содержание общего билирубина в сыворотке крови телят на 2—3-й дни жизни увеличивается в 2 раза по сравнению с уровнем до первого поения молозивом (табл. 88) **[6]**. В дальнейшем, с 5-го дня жизни, количество билирубина несколько снижается и остается стабильным до 30-дневного возраста. Конъюгированный билирубин обнаруживается лишь у 20 % 5-дневных телят в следовых количествах, а в дальнейшем не определяется. Таким образом, печень телят с 5-дневного возраста оперативно выполняет функции глюкуронирования и выведения конъюгированного билирубина в желчные капилляры, а поэтому этот период можно считать становлением билирубинсинтезирующей и билирубинвыделительной функций органа. У жеребят количество билирубина в первые дни жизни значительно больше, чем у телят, его уровень постепенно снижается и стабилизируется в месячном возрасте. На этом уровне (5,0—18,0 мкмоль/л) он поддерживается стабильно до 12-месячного возраста (табл. 89). В отличие от телят в сыворотке крови жеребят в небольшом количестве определяется конъюгированный билирубин. С 20-дневного до 6-месячного возраста максимальное количество его не превышает 8 мкмоль/л, а затем в последующие 6 мес — 4 мкмоль/л (см. табл. 89). Средний показатель холебилирубина стабильный с 5-дневного возраста: от 1,8 ± 0,4 до 3,5 ± 0,52 мкмоль/л.

89. Содержание билирубина и мочевины у жеребят (В. И. Головаха, 2003)

Возраст	Билирубин, мкмоль/л		Мочевина, ммоль/л
	общий	конъюгированный	
1-й день	20,4—50,0 (34,0 ± 3,40)	0,2—14,5 (5,4 ± 0,53)	0,2—8,0 (4,3 ± 0,58)
5 дней	11,2—55,0 (24,4 ± 2,4)	0,2—9,5 (3,0 ± 0,61)	1,0—8,0 (3,4 ± 0,38)
10 дней	13,0—26,5 (18,0 ± 0,82)	0,5—4,0 (1,8 ± 0,14)	1,5—4,0 (2,7 ± 0,17)
20 дней	8,0—21,0 (17,0 ± 1,25)	0,6—7,0 (2,6 ± 0,30)	1,1—4,0 (2,9 ± 0,12)
30 дней	7,2—20,8 (13,0 ± 0,64)	0,5—8,0 (3,5 ± 0,49)	1,0—6,0 (3,7 ± 0,22)
3 мес	8,4—17,0 (13,7 ± 0,84)	0,2—7,0 (2,9 ± 0,52)	1,6—8,0 (5,0 ± 0,26)
6 мес	5,0—16,0 (10,9 ± 0,75)	0,5—7,8 (3,5 ± 0,52)	3,0—6,5 (5,0 ± 0,17)
9 мес	8,0—18,0 (13,5 ± 0,99)	2,0—3,7 (2,8 ± 0,16)	3,9—7,0 (5,0 ± 0,21)
12 мес	8,0—16,0 (12,2 ± 0,56)	2,0—3,4 (2,7 ± 0,26)	3,8—6,5 (4,3 ± 0,34)

Количество мочевины у телят увеличивается на 2—3-й дни после рождения и остается стабильным в течение первого месяца (см. табл. 88). То же можно отметить и у жеребят. Содержание мочевины с 1-го дня жизни не превышает 8,0 ммоль/л, а в 12-месячном возрасте — 6,5 ммоль/л (см. табл. 89). Стабильность ее уровня свидетельствует о быстром становлении мочевинообразовательной функции печени. Вероятно, и телята, и жеребята очень чувствительны к гипераммониемии.

Активность аспарагиновой трансферазы (АСТ) у телят стабилизируется на 5-й день жизни, остается без достоверных изменений в течение первого месяца жизни (табл. 90). В отличие от АСТ изменения активности аланиновой трансферазы (АЛТ) имеют несколько иной характер. Если в первые 2—3 дня жизни активность фермента также увеличивается в 1,5 раза, то понижение и ее стабилизация наблюдаются на 20—30-й дни жизни.

90. Активность некоторых ферментов сыворотки крови у клинически здоровых телят (В. И. Головаха, 1995)

Показатель	День жизни					
	1-й	2—3-й	5-й	10-й	20-й	30-й
ГГТ, мккат/л	0,22—0,66	2,0—15,0	0,6—14,0	0,6—4,9	0,2—2,0	0,4—0,8
M ± m	0,48 ± 0,09	7,8 ± 1,7	5,8 ± 1,0	2,13 ± 0,36	1,12 ± 0,18	0,67 ± 0,08
АСТ, ммоль/л	0,36—1,44	1,01—1,5	0,68—1,5	0,84—1,44	0,83—1,4	0,83—1,3
M ± m	0,76 ± 0,13	1,22 ± 0,06	1,08 ± 0,08	1,12 ± 0,06	1,08 ± 0,08	1,12 ± 0,04
АЛТ, ммоль/л	0,17—0,86	0,4—1,15	0,36—1,15	0,36—1,15	0,18—0,8	0,18—0,55
M ± m	0,5 ± 0,07	0,94 ± 0,09	0,72 ± 0,09	0,65 ± 0,07	0,43 ± 0,04	0,36 ± 0,02

Примечание. Для пересчета мккат/л в нкат/л результат в мккат/л необходимо умножить на 1000.

Достаточно вариабельны изменения активности γ-глутамилтрансферазы (ГГТ; этот фермент называют также γ-глутамилтранспептидазой). До первой выпойки молозива активность фермента составляет 0,22—0,66 мккат/л, а после 2—3-кратного поения увеличивается в 15—30 раз (см. табл. 90). Это объясняется развитием физиологического холестаза. В дальнейшем активность фермента уменьшается, стабилизируется в месячном возрасте, незначительно превышая показатели взрослых животных [6].

У телят, больных колибактериозом и ротавирусным энтеритом, нарушается альбуминсинтезирующая и пигментная функции печени. Содержание альбуминов у них меньше 27 г/л (в среднем 21,7 ± ± 0,8 г/л), что составляет 37,8 % общего белка (у здоровых телят альбуминов на 5-й день жизни в среднем 27,5 ± 3,1 г/л). Содержание билирубина увеличивается в 2—2,5 раза. Под влиянием бакте-

риальной интоксикации нарушается структура мембран гепатоцитов, что способствует усилению элиминации в кровь АСТ и АЛТ: активность АСТ на 3-й день жизни составила 1,8 ± 0,47 ммоль/л, АЛТ — 1,26 ± 0,043 (у здоровых соответственно 1,22 ± 0,06 и 0,58 ± ± 0,082). Активность ферментов, белоксинтетическая и пигментная функции у переболевших колибактериозом телят не восстанавливаются в течение первого месяца жизни **[6]**.

Активность АСТ у жеребят постепенно повышается, в 6-месячном возрасте стабилизируется и не отличается от активности у кобылиц (табл. 91). Максимальная активность фермента — 1130 нкат/л (4,0 ммоль/л). Активность АЛТ после 6-месячного возраста снижаются и приближается к показателям взрослых животных. Максимальный уровень фермента составляет 170 нкат/л (0,6 ммоль/л).

У новорожденных жеребят в отличие от телят активность ГГТ не повышается, т. е. физиологический холестаз для них не типичный

91. Активность ферментов у жеребят украинской верховой породы (В. И. Головаха, 2003)

Показатель	День жизни				
	1-й	5-й	10-й	20-й	30-й
АСТ, нкат/л	150,0—1060,0	81,0—970,0	620,0—940,0	520,0—1020,0	570,0—1060,0
M ± m	568,0 ± 12,5	667,0 ± 36,1	778,0 ± 16,7	794,0 ± 21,1	817,0 ± 16,4
АЛТ, нкат/л	3,6—320,0	11,0—270,0	17,0—180,0	11,0—180,0	11,0—380,0
M ± m	83,0 ± 18,9	86,0 ± 17,2	105,5 ± 10,3	80,5 ± 8,6	125,0 ± 11,7
ГГТ, нкат/л	11,0—220,0	20,0—250,0	10,0—236,0	20,0—280,0	70,0—270,0
M ± m	110 ± 17,0	120,0 ± 14,0	125,0 ± 17,0	130,0 ± 17,0	130,0 ± 8,0
ЩФ, нкат/л	—	5,8—19,0	5,5—15,0	5,3—11,5	3,0—10,0
M ± m	—	10,53 ± 3,11	10,90 ± 1,77	7,7 ± 0,69	6,8 ± 0,6

Продолжение

Показатель	Месяц жизни			
	3-й	6-й	9-й	12-й
АСТ, нкат/л	570,0—950,0	680,0—1130,0	811,0—1000,0	769,0—1039,0
M ± m	820,0 ± 15,6	889,0 ± 15,0	922,0 ± 22,2	889,0 ± 19,4
АЛТ, нкат/л	8,9—290,0	11,0—240,0	42,0—169,0	8,0—169,0
M ± m	97,0 ± 13,9	125,0 ± 16,7	61,0 ± 9,2	78,0 ± 11,1
ГГТ, нкат/л	100,0—240,0	20,0—160,0	10,0—200,0	20,0—120,0
M ± m	100,0 ± 10,0	72,0 ± 10,0	60,0 ± 10,0	70,0 ± 10,0
ЩФ, нкат/л	4,0—8,5	1,6—8,5	2,3—6,0	—
M ± m	7,3 ± 0,36	4,9 ± 0,44	3,94 ± 0,25	—

Примечание. Активность АСТ и АЛТ определялась по методу Райтмана и Френкеля, ГГТ — по Szazs, ЩФ — в реакции гидролиза динатрийфенилфосфата.

[19]. Активность фермента в первые 3 мес колеблется от 100,0 ± 10 до 130,0 ± 18 нкат/л, а затем понижается, стабилизируется и в 12 мес ее максимальная активность не превышает 120 нкат/л (0,12 мккат/л).

Таким образом, функция печени у жеребят стабилизируется в разном возрасте. Вначале стабилизируется билирубинсинтетическая и билирубинвыделительная (в 1-й месяц жизни), затем дезинтоксикационная (в 3-месячном возрасте), углеводная, липидная (в 6 мес) и белоксинтетическая (в 12 мес).

Некоторые показатели функционального состояния печени у жеребят даны в таблице 92 [41, 43], у щенков собак служебных пород — в таблице 93 [9], у поросят — в таблице 94 [10].

92. Показатели функционального состояния печени у жеребят [41, 43]

Возраст	ГГТ, од/л	Холестерол, ммоль/л	Билирубин, мкмоль/л	
			общий	конъюгированный
< 12 ч	13—39	2,9—11,2	15,4—47,9	5,1—10,2
Дни: 1	18—43	2,9—14,5	22,2—77,0	5,1—12,0
3	9—40	3,7—9,0	8,5—66,7	3,4—13,7
5	8—89	3,3—9,3	20,5—61,6	1,7—12,0
7	14—64	3,7—11,5	13,7—51,3	5,1—12,0
14	16—169	4,2—7,4	12,0—37,6	5,1—10,2
21	16—132	1,9—7,1	8,6—27,4	3,4—8,5
28	17—99	2,1—6,0	8,6—29,0	1,7—10,2
60	8—38	2,6—6,3	8,6—34,2	3,4—8,5
90	0—27	2,9—5,8	6,8—34,2	1,7—12,0
120	0—27	2,4—5,4	5,1—17,1	1,7—10,2
150	0—30	1,32—3,5	5,1—30,8	1,7—12,0
180	0—26	2,1—4,5	—	—
270	0—26	0,3—4,8	—	—
Взрослые	5—28	1,5—2,8	8,5—30,8	3,4—12,0

93. Некоторые показатели функционального состояния печени у собак служебных пород [9]

Показатель	Щенки	Взрослые собаки
Общий белок, г/л	58,0—76 (70,6 ± 1,3)	74,2 ± 0,77
Альбумины, г/л	34,2 ± 1,8	37,3 ± 0,7
Билирубин, мкмоль/л	1,76—7,7 (3,4 ± 1,4)	2,6 ± 0,19
АСТ, ммоль/л	0,44—1,04 (0,82 ± 0,07)	0,72 ± 0,03
АЛТ, ммоль/л	0,47—1,1 (0,71 ± 0,08)	0,83 ± 0,04
ГГТ, мккат/л	0,12—0,64 (0,31 ± 0,11)	0,2 ± 0,025
Мочевина, ммоль/л	3,0—7,0 (5,5 ± 0,3)	5,4 ± 0,2
Креатинин, мкмоль/л	40,0—150,0(103,0±14,4)	104,0 ± 4,2

94. Некоторые показатели функционального состояния печени у поросят 1,5—2-месячного возраста [10]

Показатель	M ± m	Показатель	M ± m
АсАТ, мккот/л	0,35 ± 0,013	Общий белок, г/л	59,9 ± 0,44
АлАТ, мккот/л	0,54 ± 0,018	IgA + G, г/л	12,44 ± 0,38
ЛДГ, мккат/л	15,67 ± 0,62	А/Г	2,06 ± 0,09
Билирубин, мкмоль/л:		Тимоловая проба, ед. S-H	1,20 ± 0,146
общий	До 7,0		
конъюгированный	1,47 ± 0,43		

10.7. НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ВИТАМИННОГО ОБМЕНА У МОЛОДНЯКА

Витамин А. Известно, что у сельскохозяйственных животных различных видов, кроме крупного рогатого скота, каротин в сыворотке крови не определяется не только у молодняка, но и у взрослого поголовья, поэтому диагностика А-витаминной недостаточности возможна только по уровню ретинола в сыворотке крови, печени, молозиве, молоке и желтках яиц. У новорожденных телят каротин также не определяется, а затем его уровень немного повышается, находится в пределах от 20—50 мкг/100 мл у 30-дневных до 150 мкг/100 мл у 3-месячных телят, но его содержание не коррелирует с содержанием ретинола в сыворотке крови, и поэтому определение каротина не имеет диагностического значения. У 3—5-дневных телят содержание витамина А в сыворотке крови колеблется в пределах от 9 до 15 мкг/100 мл, у 30-дневных — 12,5—25; 2—3-месячных — 15—35 мкг/100 мл [5, 31], у животных старше 6-месячного возраста — 30—80 мкг/100 мл [40]. У поросят содержание витамина А в сыворотке крови составляет 20—50 мкг/100 мл [2].

Молодняк отличается также содержанием ретинола в печени. У однодневных телят он составляет 6—10 мкг/г, у 9—12-месячных — 30—90; у однодневных поросят — 9—12 зимой и 15—17 мкг/г летом, у 2-недельных поросят — 12—20, у 1—2-месячных — 15—30, в группе выращивания — 25—60 мкг/г [2].

Содержание ретинола в печени суточного молодняка птицы является объективным критерием обеспеченности маточного поголовья витамином А (коэффициент корреляции для разных видов составляет 0,96—0,99). В печени суточных цыплят содержание его находится в пределах 20—30 мкг/г, в печени утят — 12—80, гусят — 25—140, индюшат — 40—50, у молодняка кур не менее 60 мкг/г [2].

Витамин D. Известно 6 витаминов группы D: D_2—D_7. Наиболее распространенными в природе являются витамин D_2 (эргокальциферол) и D_3 (холекальциферол). Биологическая активность их отличается: активность витамина D_3 для животных различных видов в 10—100 раз выше, чем витамина D_2. Оба витамина биологически инертны и являются лишь предшественниками активных метаболитов. Первый из них — $25OHD_3$ (или $25OHD_2$) синтезируется в печени, другие — $24,25(OH)_2D_3$ и $1,25(OH)_2D_3$ — в почках. Наиболее активный метаболит — $1,25(OH)_2D_3$ — 1,25-дигидроксихолекальциферол (кальцитриол).

Сведения об уровне метаболитов в крови животных, в частности молодняка, довольно ограничены. У молодняка крупного рогатого скота содержание $25OHD_3$ составляет 30—70 нг/мл, у телят, больных рахитом, — 7—14 нг/мл [20], у птицы — около 10 нг/мл. Среднее содержание метаболитов витамина D приведено в таблице 95 [42].

95. Содержание витамина D_3 и его метаболитов в плазме крови молодняка животных (E. Kolb, E. $G_{rün}$)

Показатель	КРС	Овцы	Свиньи	Собаки
Витамин D_3, нг/мл	1,7 ± 0,7	0,6 ± 0,5	10,2 ± 4,1	2,3 ± 0,3
$25(OH)D_3$, нг/мл	36,9 ± 7,1	12,9 ± 5,3	75,0 ± 21,0	25,3 ± 3,9
$24,25(OH)_2D_3$, нг/мл	2,6 ± 0,7	4,3 ± 0,7	20,2 ± 10,3	2,3 ± 0,2
$1,25(OH)_2D_3$, пг/мл	38,0 ± 10,0	36,0 ± 30,0	60,0 ± 7,0	21,0 ± 2,0

Следует отметить, что у собак и кошек витамин D_3 в коже под влиянием ультрафиолетового облучения не синтезируется. У молодняка животных кроме экзогенных факторов в патологии D-витаминного обмена существенное значение имеют эндогенные: а) уменьшение всасывания витамина в кишечнике при хроническом гастроэнтерите; б) уменьшение синтеза $25OHD_3$ в печени при гепатодистрофии, гепатите, циррозе; в) нарушение синтеза метаболитов в почках при их поражении; г) генетические нарушения синтеза $1,25(OH)_2D_3$; д) нарушение синтеза рецепторных белков в органах-мишенях к активным метаболитам витамина D [2].

Токоферол. Известно 7 соединений, имеющих биологическую активность токоферола. Наиболее активен α-токоферол. При дефиците токоферола в кормах у цыплят, утят и индюшат развивается энцефаломаляция с типичным поражением мозжечка. Кроме того, у молодняка 2—4-недельного возраста при одновременном дефиците селена развивается экссудативный диатез, у утят — мышечная дистрофия, нефроз и язвы гладких мышц мышечного желудка, часто — пероз, у поросят и ягнят — мышечная дистрофия. В 100 мл сыворотки крови клинически здоровых телят содержится 0,3—0,7 мг токоферола, ягнят — не менее 0,25, птицы — 0,9—1,0, поросят — 0,2—0,4 мг.

Тиамин (витамин B_1). У взрослых жвачных тиамин синтезируется микроорганизмами преджелудков, у моногастричных животных — в толстом кишечнике. У телят до 3—4-месячного возраста и молодняка при жомовом откорме и животных других видов синтез тиамина недостаточный. Кроме того, у поросят при гепатодистрофии нарушаются процессы фосфорилирования свободного тиамина в гепатоцитах и количество биологически активных соединений тиамина, особенно тиаминдифосфата (кокарбоксилазы), уменьшается [4]. При дефиците тиамина в клетках головного мозга нарушается обмен углеводов, уменьшается превращение пировиноградной кислоты. Кроме нее в нейронах накапливается молочная и глиоксановая кислоты, развивается некроз нейронов (кортико-церебральный некроз), который особенно выражен у телят, ягнят и пушных зверей.

В сыворотке крови клинически здоровых телят содержится 7—15 мкг/100 мл тиамина, у новорожденных поросят — 10—25, а тиаминдифосфата — 5—10 мкг, у отъемышей соответственно

20—35 и 10—25 мкг/100 мл. При недостаточности тиамина в сыворотке крови повышается содержание пировиноградной (у телят более 1,7 мг/100 мл, в норме — 0,8—1,5, у норок до 3,5—5,0 мг/100 мл по сравнению с 1,6—2,4 у здоровых) и молочной (свыше 13 мг/100 мл, или 1,44 ммоль/л) кислот. Содержание тиамина в печени больных телят меньше 20 мкг/100 г, новорожденных поросят — 30, отъемышей — 40, норок — 100, песцов — 60, нутрий — 30 мкг/100 г [2].

Рибофлавин (витамин B_2). У жвачных животных он синтезируется микрофлорой преджелудков, а у моногастричных — только кишечника. Рибофлавин в печени превращается в флавинадениндинуклеотид (ФАД) и частично в флавинмононуклеотид (ФМН). Оба соединения являются коферментами более 60 флавиновых ферментов (флавопротеинов), которые активно участвуют в тканевом дыхании, окислении амино- и оксикислот, глюкозы, альдегидов, НАДН и НАДФН.

Недостаточность рибофлавина чаще отмечают у птицы, пушных зверей, поросят, реже — у жвачных. У телят и ягнят B_2-гиповитаминоз развивается в ранний период жизни до начала функционирования преджелудков, у пушных зверей — при дефиците в рационе мяса, печени, молока, дрожжей, при хронических расстройствах пищеварения, угнетении жизнедеятельности микрофлоры антибактериальными средствами.

Содержание рибофлавина в крови телят составляет 8—16 мкг/100 мл, в печени 30—65 мкг/г, в печени поросят 30—44, кур 15—22; норок — не менее 13, песцов — не менее 15 мкг/г [2]. Объективным критерием обмена рибофлавина у птицы является содержание его в яйцах: в белке яиц кур и индюшек 2—3 мкг/г, в желтке 3—5 мкг/г, уток и гусей соответственно 1—2 и 6—7 мкг/г [2].

Содержание ФАД в крови здоровых телят составляет 8—16 мкг/100 мл, в крови больных — 2,7—6,0 мкг/100 мл. Хороший источник витамина B_2 для молодняка — молозиво и молоко. Больше всего его у овцематок (около 20 мг в 1 л молозива и 4 мг в 1 л молока), меньше — у коров, коз и свиноматок (5—7 и 1,5—2,3 мг/л), меньше всего — в молоке кобыл (0,15—0,65 мг/л).

Никотиновая кислота (витамин B_5). У взрослых жвачных она синтезируется микроорганизмами в преджелудках, у телят — эндогенно из аминокислоты триптофана, у свиней — в тканях из триптофана и микроорганизмами в толстом кишечнике. У собак, кошек и пушных зверей (норок, лисиц, песцов) синтез никотиновой кислоты из триптофана ограничен. У кошек фермент, отвечающий за альтернативный «нениациновый» путь превращения триптофана, довольно высокоактивен, поэтому синтез никотиновой кислоты ограничен.

Никотиновая кислота в печени превращается в активную форму — никотинамид, который, соединяясь с нуклеотидами, превращается в два кофермента — никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидофосфат (НАДФ), которые являются первым звеном в цепи тканевых дыхательных фермен-

тов. Никотиновые коферменты участвуют в обмене углеводов, жиров, аминокислот, спиртов. НАД и НАДФ входят в состав ферментов клеточного ядра, митохондрий, эндоплазматического ретикулума, участвуют в различных реакциях.

Обмен никотиновой кислоты контролируют по ее содержанию в печени, крови и молоке [2]. В 100 г печени телят ее содержится 12,0—25,0 мг, поросят — 10—27,5, овец — 36—46; птицы — 10—20 мг; лошадей — 3,7—10,5 мг. В крови свиней содержится 3,2—7,5 мкг/мл никотиновой кислоты, овец — 3,6—13,0, собак — 3,6—6,7 мкг/мл.

Цианкобаламин (витамин B_{12}). У взрослых жвачных при достаточном количестве в рационе кобальта и протеина он синтезируется микроорганизмами в преджелудках и толстом кишечнике. У животных с однокамерным желудком микробный синтез не удовлетворяет их потребности, поэтому свиньи, птицы, собаки и пушные звери нуждаются в дополнительном поступлении витамина с кормом. У птиц большинство микроорганизмов синтезируют цианкобаламин, наиболее интенсивно — в толстых кишках. Норки, лисицы и песцы употребляют мясные и рыбные продукты, богатые витамином B_{12}, поэтому у них может развиваться только эндогенный B_{12}-гиповитаминоз.

Цианкобаламин стимулирует эритроцитопоэз, влияя на превращение фолиевой кислоты (витамин B_c) в тетрагидрофолиевую, которая ускоряет созревание эритроцитов. Дефицит витамина B_{12} нарушает эту реакцию, в эритро- и нормобластах уменьшается синтез ДНК, поэтому их деление и созревание задерживаются.

Витамин B_{12} стимулирует превращение пропионовой кислоты в глюкозу. Вначале она превращается в метилмалонил-КоА, а затем — в сукцинил-КоА. Последняя реакция катализируется ферментом метилмалонил-КоА-изомеразой, которой необходим витамина B_{12}-кофермент — дезоксиаденозилкобаламин. При дефиците витамина B_{12} активность фермента снижается, что сопровождается накоплением в крови и моче метилмалоновой кислоты (ММК).

Контроль за состоянием обмена цианкобаламина проводят за его содержанием в крови, молозиве, молоке, печени и желтках яиц. В крови телят содержится 0,10—0,19 мкг/л цианкобаламина **[21]**, жеребят — 1,5—6,5, кроликов — 30 мкг/л [3]. Уменьшение содержания витамина B_{12} коррелирует ($r = -0,67$) с увеличением концентрации ММК в моче до 6,2—11,0 мкмоль/л (8,23 ± 1,03). Оптимальное количество ее в моче составляет 1,8—3,9 мкмоль/л (2,9 ± 6,73), при гипокобальтозе увеличивается до 8,23 ± 1,03 **[21]**.

Молозиво коров содержит в 1 л 17—50 мкг витамина B_{12}, свиней — 0,5— 3,2 мкг; молоко соответственно 5—9 и 1,2—3,3 мкг/л; молоко овец — 5—9, коз — 0,18—0,8, кобыл — 0,5—2,3, крольчих — 50—60 мкг/л. Содержание витамина B_{12} в желтках яиц составляет не менее 8 мкг/кг. Оптимальное содержание витамина в печени 4-недельных цыплят — 450—500 мкг/кг, утят — 290—620 мкг/кг **[2, 3]**.

10.8. ГОМЕОСТАЗ МИНЕРАЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Кальций. Особых отличий в обмене и содержании кальция в сыворотке крови молодняка и взрослых животных нет. В костной ткани молодняка относительное содержание обменного кальция больше (9—11 %), чем у взрослых животных (3—5 %). В сыворотке крови молодняка кальция содержится 10—12 мг/100 мл (2,5—3 ммоль/л). У поросят возможна врожденная патология абсорбции кальция, которая обусловлена аутосомным рецессивным фактором.

Фосфор. Содержание фосфора в организме животных и соотношение его с кальцием зависят от степени физиологической зрелости молодняка. У телят соотношение между кальцием и фосфором оптимальное (1,7—1,8). Содержание неорганического фосфора в сыворотке крови молодняка выше, чем у взрослых животных: у телят — 5,5—7,5 мг/100 мл (1,78—2,42 ммоль/л), у поросят — 6,0—8,0 мг/100 мл (1,94—2,58 ммоль/л).

Уменьшение содержания неорганического фосфора в сыворотке крови наблюдается при дефиците его в рационе, недостаточном усвоении в кишечнике, гиперфункции паращитовидных желез, когда уменьшается реабсорбция фосфора в канальцах почек, а потери его с мочой увеличиваются.

Увеличение содержания неорганического фосфора — *гиперфосфатемия* — развивается при уменьшении секреции паратгормона и увеличении кальцитонина (стимулируется реабсорбция фосфора в почках), передозировке холекальциферола. У людей регистрируется врожденная патология обмена фосфора.

Кобальт. Клинически здоровые телята содержат кобальта 0,478—0,654 мкмоль/л (2,8—3,85 мкг/100 мл), при дефиците — 0,194—0,357 мкмоль/л **[21]**. Между содержанием кобальта и витамина B_{12} в крови установлена корреляционная зависимость высокого уровня ($r = +0,93$).

Динамика содержания железа, меди и кобальта в сыворотке крови телят до 30—40-дневного возраста представлена в таблице 96 **[32]**.

96. Содержание микроэлементов в сыворотке крови телят, мкмоль/л (В. М. Соколюк, 1997)

Возраст телят, дней	Железо	Медь	Кобальт
1—3	16,0—26,0 (22,2 ± 0,8)	14,0—22,0 (18,2 ± 0,8)	— —
10	14,5—26,0 (20,2 ± 1,1)	10,0—22,5 (16,1 ± 1,0)	0,45—0,80 —
20	13,0—23,0 (18,3 ± 1,3)	9,0—20,5 (14,4 ± 1,4)	— —
30—40	14,5—21,5 (17,9 ± 1,3)	9,5—14,0 (11,6 ± 1,0)	0,4—0,75 —

Железо. Входит в состав более 70 ферментов. Все соединения, содержащие железо, можно разделить на две группы: а) порфириновые, т. е. содержащие железо в составе гема (гемоглобин, миоглобин, цитохромы, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза); б) соединения, содержащие негеминовое железо (трансферрин, ферритин, гемосидерин).

Дефицит железа (гемосидероз) — одна из наиболее распространенных патологий у молодняка сельскохозяйственных животных, особенно у поросят и телят. Для характеристики железодефицитной анемии используют различные показатели крови: количество гемоглобина и его содержание в одном эритроците, количество железа в сыворотке крови (анемия развивается при 70 мкг/100 мл и менее, т. е. 12,5 мкмоль/л), общую и латентную железосвязывающую способность сыворотки крови (ОЖСС и ЛЖСС), содержание трансферрина (СТ) и коэффициент насыщения трансферрина железом (КНТ). Динамика некоторых перечисленных показателей приведена в таблице 97 **[29]**. При анемиях уменьшается концентрация сывороточного ферритина, поэтому компенсаторно увеличивается количество транспортного для железа белка — трансферрина. Вследствие уменьшения содержания железа в сыворотке крови и увеличения трансферрина уменьшается коэффициент насыщения трансферрина железом (в 3—3,5 раза), а общая железосвязывающая способность сыворотки крови увеличивается, т. е. количество железа, которое может связываться с трансферрином, возрастает (у поросят до 70 мкмоль/л против 40 у здоровых) **[29]**.

97. Показатели обмена железа в организме поросят (М. Г. Николадзе, 2002)

Показатель	Возраст, дней				
	2—4	9—11	16—18	24—28	30—32
СЖ, мкмоль/л	18,9 ± 2,09	35,8 ± 1,04	41,4 ± 2,18	27,1 ± 2,52	25,7 ± 1,83
ОЖСС, мкмоль/л	50,2 ± 2,35	50,3 ± 1,64	48,7 ± 1,83	46,2 ± 1,49	54,5 ± 1,86
ЛЖСС, мкмоль/л	31,3 ± 2,20	14,5 ± 0,95	7,3 ± 0,42	19,1 ± 1,14	28,8 ± 1,31
СТ, г/л	66,91 ± 0,34	7,28 ± 0,42	5,97 ± 0,39	7,03 ± 0,42	7,50 ± 0,45
КНТ	0,37 ± 0,05	0,71 ± 0,07	0,85 ± 0,09	0,59 ± 0,07	0,47 ± 0,06

Поскольку железосвязывающая способность сыворотки крови возрастает, а содержание железа в ней уменьшается, то увеличивается латентная железосвязывающая способность сыворотки крови (у поросят — в 4—6 раз).

Селен. Содержание селена в крови клинически здоровых телят находится в пределах от 65,0 до 87,0 нг/мл (6,5—8,7 мкг/100 мл), при недостатке —25,0—36,0 нг/мл. Низкий уровень селена —

причина уменьшения активности глутатионпероксидазы до 172—238 мкмоль/мин GSH на 1 г гемоглобина по сравнению с 325—407 у здоровых телят [21].

Цинк. Найден более чем в 200 металлоферментах, которые принимают участие в различных метаболических процессах, включая синтез и распад углеводов, липидов, белков и нуклеиновых кислот. В сыворотке крови телят цинка содержится 100—150 мкг/100 мл (15,4—23 мкмоль/л), поросят — 100—160 (15,4—24,6 мкмоль/л). *При недостаточности цинка нарушается процесс рогообразования,* ибо клетки эпидермиса не вырабатывают кератогиалин. Вследствие этого эпидермис сильно утолщается, в роговом шаре нагромождаются недостаточно созревшие клетки с остатками ядер. Наиболее типично заболевание проявляется у поросят в возрасте от 1,5—2 до 4 мес.

10.9. ГОРМОНАЛЬНЫЙ СТАТУС МОЛОДНЯКА

У млекопитающих изучено 10 желез внутренней секреции, которые формируют эндокринную систему, вырабатывающую специфические биологически активных соединения — гормоны. Гормональный статус сельскохозяйственных животных, особенно молодняка, остается малоизученным.

Содержание **трийодтиронина** (T_3) и **тироксина** (T_4) в первые часы и дни жизни довольно вариабельно (табл. 98).

По данным В. И. Головахи [6], содержание тироксина у однодневных телят составляет в среднем 89,0 ± 21,4 нмоль/л, у 10-дневных — 78,0 ± 20,1, у 20-дневных — 66,0 ± 6,9 нмоль/л. Примерно такие же данные (50—120 нмоль/л) у телят 10—20-дневного возраста приводят В. В. Ковзов [15] (1999) и В. Л. Романюк [30] (2002). Количество T_3 находится в пределах от

98. Динамика уровня гормонов в плазме крови телят (Б. В. Кректун с соавт., 1998)

Возраст, дней	Показатели			
	Инсулин, мкЕд/мл	T_4, нмоль/л	T_3, нмоль/л	Кортизол, нмоль/л
Новорожденные	8,75 ± 0,76	95,94 ± 11,9	10,48 ± 0,98	241,3 ± 40,0
1 ч	29,84 ± 2,4	157,21 ± 7,73	9,5 ± 0,94	159,6 ± 34,3
3 ч	11,87 ± 2,03	276,18 ± 11,72	12,87 ± 1,2	130,64 ± 21,76
6 ч	10,66 ± 2,1	270,46 ± 0,4	12,86 ± 1,8	123,4 ± 9,1
12 ч	16,59 ± 2,5	179,37 ± 22,6	10,27 ± 1,01	80,48 ± 3,2
24 ч	8,30 ± 1,4	153,17 ± 15,62	10,74 ± 3,55	95,0 ± 9,6
2-й день	6,63 ± 1,2	126,98 ± 7,8	8,16 ± 0,28	58,19 ± 6,9
3-й день	7,67 ± 1,46	82,40 ± 6,81	4,26 ± 0,36	58,75 ± 11,0
5-й день	7,85 ± 1,42	64,32 ± 9,28	3,82 ± 0,66	88,76 ± 13,75

1,9 до 3,5 нмоль/л. У телят с врожденным зобом установлена гиперфункция щитовидной железы. Прежде всего у них увеличивается содержание T_3 [15].

Функция щитовидной железы изменяется при некоторых внутренних болезнях: при бронхопневмонии уменьшается количество связанного с белком йода (в норме 4—10 мкг/100 мл, т. е. 315—780 мкмоль/л), при колибактериозе и ротавирусном энтерите — увеличивается.

Секреция T_3 и T_4 регулируется тиреотропным гормоном гипофиза, количество которого у телят раннего возраста составляет 0,37 ± 0,14—0,51 ± 0,15 мМЕ/л.

Кортизол. Вырабатывается корой надпочечников из холестерола. Секреция его стимулируется адренокортикотропным гормоном гипофиза (АКТГ). В первые часы жизни телят концентрация кортизола в плазме крови довольно высокая, на 2-й день уменьшается, а начиная с 5-го дня вновь увеличивается. Иные данные приведены в работе В. И. Головахи [6]: количество кортизола увеличивается с 1-го по 10-й день в 4 раза, на 20-й еще в 1,5 раза, составляя соответственно 9,1 ± 3,8, 40,0 ± 4,3 и 64,0 ± ± 1,1 нмоль/л.

Гипо- и гиперфункция коры надпочечников чаще встречается у собак, особенно у самок молодого и среднего возраста.

Инсулин. Секретируется β-клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Он является единственным гипогликемическим гормоном. Наибольшее содержание инсулина в плазме крови телят через 1 ч после рождения, затем уменьшается, стабилизируясь на 2—3-й дни жизни. При колибактериозе и ротавирусном энтерите содержание инсулина уменьшается.

Содержание некоторых гормонов в плазме крови молодняка крупного рогатого скота приведено в таблице 99.

99. Концентрация гормонов в плазме крови бычков черно-пестрой породы (В. П. Радченко, Е. В. Бугров и др., 1980) [2]

Показатель	Возраст, мес			
	1—1,5	4,5—5	10—11	13,5—14
СТГ, нг/мл	7—9	6—12	7—18	6—11
Тестостерон, нг/л	0,06—0,21	0,29—1,32	1,13—2,4	1,38—5,6
Альдостерон, нг/л	10—32	17—58	24—44	25—52
Адреналин, нг/л	225—675	225—1350	225—1350	225—1260
Норадреналин, нг/л	117—2250	117—2700	225—3510	1125—3150
АКТГ, МЕ/100 мл	0,18—1,13	0,06—1,37	0,10—1,7	0,28—1,8
Кортизол, мкг/100 мл	1,4—2,9	1,1—3,3	1,5—4,6	2,1—4,0

ИСТОЧНИК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Безух В. М.** Якість молозива корів і його вплив на неспецифічну резистентність та стан здоров'я телят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Біла Церква, 1998. — 17 с.
2. **Ветеринарна** клінічна біохімія / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін.; За ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. — Біла Церква, 2002. — 400 с.
3. **Витамины** в питании животных / А. Р. Вальдман, П. Ф. Сурай, П. А. Ионов, Н. И. Сахацкий. — Харьков, 1993. — 423 с.
4. **Вишнякова Л. В.** Профилактика недостаточности тиамина у свиноматок и поросят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Воронеж, 1989. — 17 с.
5. **Гарькавий В. О.** А- і D-гіповітамінози у телят (поширення, діагностика, лікування і профілактика): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Біла Церква, 2002. — 18 с.
6. **Головаха В. И.** Вторинный гепатоз телят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — К., 1995. — 24 с.
7. **Головаха В. І.** Функціональний стан печінки у лошат // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун.-ту. — Вип. 2, ч. 1. — Біла Церква, 1997. — С. 24—27.
8. **Дацьків О. В.** Концентрація імуноглобулінів у крові новонароджених телят // Вісник аграрної науки. — 2002. — № 10. — С. 74—76
9. **Дикий О. А.** Гепатодистрофія у собак службових порід (етіологія, патогенез, діагностика, лікування та профілактика): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Біла Церква, 2000. — 17 с.
10. **Емельянов В.В.** Гепатит у поросят (этиология, патогенез, диагностика и лечение при токсической форме): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Витебск, 2003. — 21 с.
11. **Карпуть И. М.** Иммунопатология у животных // Вет. и зоотехн. проблемы животн-ва.: Материалы междун. науч.-практ. конф. (г. Витебск, 28—29 нояб. 1996 г.). — Минск, 1996. — С. 36—37
12. **Карпуть И. М.** Иммунология и иммунопатология. — Минск: Ураджай, 1993. — 288 с.
13. **Клініко-біохімічний** та імунний статус телят раннього віку / В. І.Левченко, В. І. Головаха, В. П. Надточій та ін. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. — Вип. 70. — К.: Урожай, 1995. — С. 75—80.
14. **Клиническая** лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. — М.: Агропромиздат, 1985. — 287 с.
15. **Ковзов В. Н.** Иммунный статус и его коррекция у телят, больных эндемическим зобом: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Витебск, 1999. — 20 с.
16. **Козій Н. В.** Стан деяких показників білкового обміну у телят, хворих на бронхопневмонію // Вісник Білоцерків. держ. аграр. ун-ту. — Вип. 13, ч. 2. — Біла Церква, 2000. — С. 67—70.
17. **Костыня М. А.** Гипоиммуноглобулинемия новорожденных телят: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.01. — Воронеж, 1997. — 39 с.
18. **Кравців Ю. Р.** Імуноглобуліни корів різного віку та їхніх телят // Україн. біохім. журнал. — 1998. — Т. 70, № 1. — С. 94—98.
19. **Левченко В. І., Головаха В. І., Галятюк О. Є.** Діагностика патології печінки у коней: Метод. реком. — К., 2003. — 28 с.
20. **Левченко В. И., Лагута Г. В.** Эффективность различных препаратов холекальциферола // Использование физических и биологических факторов в ветеринарии и животноводстве: Материалы Всесоюз. науч. конф. (г. Витебск, 11—12 сент. 1991 г.). — М., 1992. — С. 79—80.
21. **Личук М. Г.** Рання діагностика, профілактика і лікування мікроелементозів (Se і Co) телят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Біла Церква, 2002. — 18 с.

22. **Любецька Т. В., Мельничук Д. О.** Особливості кислотно-лужного стану крові тільних корів і новонароджених телят // Науковий вісник Львів. держ. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. — Т. 2 (№ 2), ч. 2. — Львів, 2000. — С. 182—186.
23. **Любецька Т. В.** Особливості метаболічної адаптації телят на ранніх етапах постнатального розвитку та шляхи корекції виявлених порушень: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 03.00.04. — К., 2000. — 37 с.
24. **Любецька Т., Гриценко В., Мельничук Д.** Респіраторно-метаболічний ацидоз неонатальних телят та його компенсація // Вет. медицина України. — 1999. — № 5. — С. 26—27.
25. **Маслянко Р. П., Кравців Ю. Р., Кравців Я. С.** Вікові особливості імунної системи у тварин // Біологія тварин. — Т. 4, № 1—2. — Львів, 2002. — С. 9—15.
26. **Маслянко Р. П.** Основи імунобіології. — Львів, 1999. — 472 с.
27. **Мельничук Д. О., Усатюк П. В., Цвіліховський М. І.** Трансепітеліальний механізм формування колострального імунітету новонароджених телят // Науковий вісник Національ. аграр. ун-ту. — Вип. 11. — К., 1998. — С. 17—19.
28. **Москаленко В. П.** Структурно-функціональні властивості еритроцитів у здорових і хворих на анемію телят та їх зміни при лікуванні: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Біла Церква, 1999. — 18 с.
29. **Николадзе М. Г.** Диагностика и профилактика алиментарной анемии и иммунной недостаточности у поросят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Витебск, 2002. — 18 с.
30. **Романюк В. Л.** Патофізіологічні та екологічні аспекти уродженого ендемічного зоба у телят на Рівненщині: Автореф. дис. ... канд.. біол. наук: 03.00.13. — Київ, 2002. — 18 с.
31. **Сахнюк В. В.** Діагностика, лікування та профілактика А-гіповітамінозу у корів і телят: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — К., 1996. — 18 с.
32. **Соколюк В. М.** Анемія телят (поширення, діагностика, лікування і профілактика): Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — Сімферополь, 1997. — 22 с.
33. **Становлення** і розвиток імунологічної реактивності телят у ранньому віці / О. М. Дацьків, Ю. Р. Кравців, Я. С. Кравців та ін. // Біологія тварин. — Т. 2, № 2. — Львів, 2000. — С. 43—51.
34. **Теленчев В. А.** Синдромы возрастных иммунодефицитов // Ученые записки Витеб. госуд. акад. вет. медицины. — Т. 34. — Витебск, 1998. — С. 86—88.
35. **Федоров Ю. Н.** Иммунологический мониторинг: тенденции развития, возможности и реальность // Вет. патология: Современные достижения и проблемы клеточной биотехнологии и иммунологии в ветеринарной медицине. — 2003. — № 1 (5). — С. 79—85.
36. **Флюнт Р. Б., Маслянко Р. П., Падовський А. І.** Імунний статус корів і їх телят при недоношеній вагітності // Науковий вісник Львів. держ. акад. вет. медицини ім. С. З. Гжицького. — Т. 4 (№ 5). — Львів, 2002. — С. 197—203.
37. **Цимбал О. М., Кленіна Р. В., Красніков Г. А.** Проблеми імунодефіцитів та імуностимуляції в системі профілактики хвороб сільськогосподарських тварин // Досягнення наук. вет. медицини у профілактиці та боротьбі з хворобами с.-г. тварин (до 70-річчя ІЕКВМ). — Харків, 1994. — С. 71—87.
38. **Чумаченко В.** Резистентність тварин і фактори, що впливають на її стан // Вет. медицина України. — 1997. — № 3. — С. 23—25.
39. **Шлунково-кишкові** хвороби новонароджених телят / В. І. Левченко, В. П. Заярнюк, І. В. Папченко та ін. — Біла Церква, 1997. — 81 с.
40. **Щуревич Г. А.** Диагностика и профилактика А-гиповитаминоза у крупного рогатого скота при откорме в специализированных хозяйствах: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.01. — М., 1986. — 13 с.
41. **Bauer J. E., Asguith R. L., Kivipelto J.** Serum biochemical indicators of liver function in neonatal foals // Am. J. Vet. Res. — 1989. — Vol. 50, № 12. — P. 2037—2041.
42. **Kolb E., Grün E.** Die Bedeutung der D-Vitamine of ür das Immunsystem // Der praktische Tieraczti. — 1996. — V. 77, № 1. — S. 11—15.
43. **Patterson W. H., Brown C. M.** Increase of serum γ-glutamyltransferase in neonatal standardbred foals // Am. J. Vet. Res. — 1986. — Vol. 47, № 11. — P. 2461—2463.

ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Некоторые единицы международной системы (СИ) и их обозначения

Производные единиц СИ образуются следующим образом:

а) умножением на фактор 10^3

Префикс	Символ	Множитель
экза	Э	10^{18}
пета	П	10^{15}
тера	Т	10^{12}
гига	Г	10^{9}
мега	М	10^{6}
кило	к	10^{3}
милли	м	10^{-3}
микро	мк	10^{-6}
нано	н	10^{-9}
пико	п	10^{-12}
фемто	ф	10^{-15}
атто	а	10^{-18}

б) в особых случаях умножением на фактор 10^1

Префикс	Символ	Множитель
гекто	г	10^{2}
дека	да	10^{1}
деци	д	10^{-1}
санти	с	10^{-2}

Основные единицы системы СИ:

Метр (м)

Килограмм (кг)

Секунда (с)

Ампер (А)

Кельвин (К)

Моль (моль)

Кандела (новая свеча) (кд)

2. Атомные массы элементов

Название элемента	Символ	Атомная масса	Название элемента	Символ	Атомная масса
Азот	N	14,0067	Кадмий	Cd	112,40
Актиний	Ac	227	Калий	K	39,098
Алюминий	Al	26,9815	Калифорний	Cf	249
Америций	Am	243	Кальций	Ca	40,08
Аргон	Ar	39,948	Кислород	O	15,9994
Астат	At	210	Кобальт	Co	58,9332
Барий	Ba	137,34	Кремний	Si	28,086
Бериллий	Be	9,01218	Криптон	Kr	83,80
Берклий	Bk	297	Ксенон	Xe	131,30
Бор	B	10,811	Курчатовий	Ku	264
Бром	Br	79,904	Кюрий	Cm	247
Ванадий	V	50,9414	Лантан	La	138,9055
Висмут	Bi	208,9804	Литий	Li	6,94
Водород	H	1,0079	Лоуренсий	Lr	256

Продолжение

Название элемента	Символ	Атомная масса	Название элемента	Символ	Атомная масса
Вольфрам	W	183,85	Лютеций	Lu	174,97
Гадолиний	Gd	157,25	Магний	Mg	24,305
Галлий	Ga	69,72	Марганец	Mn	54,9380
Гафний	Hf	178,49	Медь	Cu	63,546
Гелий	He	4,00260	Менделевий	Md	257
Германий	Ge	72,59	Молибден	Mo	95,94
Гольмий	Ho	164,9340	Мышьяк	As	74,9216
Диспрозий	Dy	162,50	Натрий	Na	22,9897
Европий	Eu	151,96	Неодим	Nd	144,24
Железо	Fe	55,847	Неон	Ne	20,179
Золото	Au	196,9665	Нептуний	Np	237,0482
Индий	In	114,82	Никель	Ni	58,71
Йод	I	126,9045	Ниобий	Nb	92,9064
Иридий	Ir	192,22	Нобелий	No	255
Иттербий	Jb	173,04	Олово	Sn	118,69
Иттрий	Y	88,9059	Осмий	Os	190,2
Палладий	Pd	106,4	Таллий	Tl	204,37
Платина	Pt	195,09	Тантал	Ta	180,9479
Плутоний	Pu	242	Теллур	Te	127,60
Полоний	Po	210	Тербий	Tb	158,9254
Празеодим	Pr	140,9077	Технеций	Tc	99,97
Прометий	Pm	147,145	Титан	Ti	47,90
Протактиний	Pa	231,0359	Торий	Th	232,0381
Радий	Ra	226,0254	Тулий	Tu	168,9342
Радон	Rn	222	Углерод	C	12,011
Рений	Re	186,2	Уран	U	238,029
Родий	Rh	102,9055	Фермий	Fm	257
Ртуть	Hq	200,59	Фосфор	P	30,97376
Рубидий	Rb	85,4678	Франций	Fr	223
Рутений	Ru	101,07	Фтор	F	18,9984
Самарий	Sm	150,4	Хлор	Cl	35,453
Свинец	Pb	207,2	Хром	Cr	51,996
Селен	Se	78,96	Цезий	Cs	132,9054
Сера	S	32,06	Церий	Ce	140,12
Серебро	Ag	107,868	Цинк	Zn	65,38
Скандий	Sc	44,9559	Цирконий	Zr	91,22
Стронций	Sr	87,62	Эйнштейний	Es	254,253
Сурьма	Sb	121,75	Эрбий	Er	167,26

3. Молекулярные и эквивалентные массы веществ в окислительно-восстановительном титровании

Исходное вещество		Конечный продукт	Число эквивалентов в молекуле	Молекулярная масса	Эквивалентная масса
название	формула				
Окислители					
Хлор	Cl_2	HCl	2	71	35,5
Бром	Br_2	HBr	2	160	80
Йод	I_2	HI	2	254	127

Продолжение

Исходное вещество		Конечный продукт	Число эквивалентов в молекуле	Молекулярная масса	Эквивалентная масса
название	формула				
Гипохлорит натрия (хлорноватистокислый натрий)	NaClO	NaCl	2	74,5	37,25
Хлорат калия (хлорноватокислый калий)	$KClO_3$	KCl	6	122,6	20,4
Перманганат калия (марганцовокислый калий)	$KMnO_4$	MnO (в форме соли)	5	158	31,6
Дихромат калия (двухромовокислый калий)	$K_2Cr_2O_7$	Cr_2O_3 (в форме соли)	6	294	49
Пероксид водород (перекись водорода)	H_2O_2	H_2O	2	34	17
Хлорид железа (III) (хлорное железо)	$FeCl_3$	$FeCl_2$	1	162,2	162,2
Восстановители					
Сульфат железа (II) (сернокислое железо закисное)	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	$Fe_2(SO_4)_3$	1	278	278
Щавелевая кислота	$H_2C_2O_4 \times 2H_2O$	$CO_2 + H_2O$	2	126	63
Оксалат натрия (щавелевокислый натрий)	$Na_2C_2O_4$	$CO_2 +$ + NaOH	2	133,994	66,997
Тиосульфат натрия (серноватистокислый натрий)	$Na_2S_2O_3 \times 5H_2O$	$Na_2S_4O_6$	1	248	248

4. Коэффициенты пересчета единиц, подлежащих замене, в рекомендуемые единицы по международной системе (СИ)

Вещество	Относительная молекулярная масса	Обозначение единиц		Коэффициент пересчета в рекомендуемые единицы	Коэффициент пересчета новой единицы в старую
		подлежащих замене	рекомендуемых		
Кровь, сыворотка, плазма					
Аланинаминотрансфераза	—	мкмоль/ч.мл	ммоль/ч.л.	1,0000	—
		мкмоль/ч.мл	нмоль/с.л.	278,00	—
Аспартатаминотрансфераза	—	мкмоль/ч.мл	ммоль/ч.л.	1,0000	—
		мкмоль/ч.мл	нмоль/с.л.	278,00	—
Азот аминокислот	14,0	мг%	ммоль/л	0,7139	1,401

Продолжение

Вещество	Относительная молекулярная масса	Обозначение единиц		Коэффициент пересчета в рекомендуемые единицы	Коэффициент пересчета новой единицы в старую
		подлежащих замене	рекомендуемых		
Аскорбиновая кислота (витамин С)	176,126	мг%	мкмоль/л	56,78	0,0176
Общий белок	—	г%	г/л	10,000	0,1
Билирубин	584,881	мг%	мкмоль/л	17,10	0,05847
Гемоглобин	16114,5	г%	г/л	10,000	—
		г%	ммоль/л	0,6206	1,611
Глюкоза	180,16	мг%	ммоль/л	0,0555	18,02
Йод белковосвязанный	126,91	мкг%	нмоль/л	78,795	0,0127
Калий	39,102	мг%	ммоль/л	0,256	—
Кальций	40,08	мг%	ммоль/л	0,2500	4,00
Кобальт	58,93	мкг%	мкмоль/л	0,17	5,88
Кетоновые тела	—	мг%	г/л	0,01	100
Креатинин	113,12	мг%	ммоль/л	0,088	11,363
Лейкоциты	—	тыс. в 1 мкл	10^9/л		—
Липиды общие	—	мг%	г/л	0,01	100
Лактатдегидрогеназа	—	мкмоль/ч.мл	ммоль/ч. л	1,0000	—
Мочевая кислота	168,11	мг%	ммоль/л	0,0590	16,94
Марганец	54,939	мкг%	мкмоль/л	0,182	5,494
Магний	24,312	мг%	ммоль/л	0,4110	2,431
Медь	63,546	мг%	мкмоль/л	0,1574	6,355
Мочевина	60,06	мг%	ммоль/л	0,1665	6,006
Молочная кислота	90,079	мг%	ммоль/л	0,110	9,008
Натрий	22,989	мг%	ммоль/л	0,4350	2,299
Пировиноградная кислота	83,063	мг%	мкмоль/л	113,6	0,00806
Ретинол (витамин А)	296,456	мкг%	мкмоль/л	0,03491	28,65
Тироксин	776,874	мкг%	нмоль/л	12,87	0,07769
Токоферол	416,685	мг%	мкмоль/л	24	0,04167
Триглицериды	875	мг%	ммоль/л	0,011	90,91
Фосфатаза щелочная	—	мкмоль/ч.мл	ммоль/ч. л	1,0000	—
		мкмоль/мин.мл	ммоль/ч. л	16,667	—
Фосфор неорганический	30,9738	мг%	ммоль/л	0,3230	3,097
Фосфолипиды	774	мг%	ммоль/л	0,01292	7,740
Хлор	35,453	мг%	ммоль/л	0,2820	3,545
Холестерин	386,64	мг%	ммоль/л	0,0260	38,67
Цинк	65,38	мкг%	мкмоль/л	0,154	6,49
Эритроциты	—	млн в 1 мкл	10^{12}/л	—	—

226 бетда хам берилган

Для пересчета старой единицы в новую или новой единицы в старую известную величину умножают на коэффициент. Например, необходимо 10 мг% кальция сыворотки крови перевести в ммоль/л. Для этого 10 умножают на 0,2500 и получают 2,5 моль/л; или 2,5 ммоль/л нужно перевести в мг%, для этого 2,5 умножают на 4,00 и получают 10 мг%.

Если коэффициент неизвестен, то старые единицы переводят в новые: при переводе мг% (мг/100 мл) в ммоль пользуются формулой $n \cdot 10/M$, где n — количество вещества в 100 мл; 10 — перевод на 1 л; M — относительная молекулярная (атомная) масса вещества. При переводе мг% в мкмоль/л применяют формулу $n \times \times 10^4/M$. При переводе мкг% в мкмоль/л используют формулу $n \times \times 10/M$. При переводе мкг% в нмоль/л: $n \cdot 10^4/M$, обозначения те же.

5. Нормативы биохимических показателей крови взрослых животных

Показатель	Единица измерения	Крупный рогатый скот	Овцы	Свиньи	Лошади	Собаки	Кошки
1	2	3	4	5	6	7	8
			Цельная кровь				
Гемоглобин	г/л	99—129	79—119	99—119	90—149	110—170	100—140
Гематокрит	%	35—45	35—45	39—45	35—45	—	—
Глюкоза	мг%	40—60	40—60	60—100	55—95	80—100	70—120
	ммоль/л	2,2—3,3	2,2—3,3	3,3—5,6	3,1—5,3	3,4—5,6	3,9—6,9
Кетоновые тела (сумма)	мг%	1,0—6,0	1,0—3,0	0,5—2,5	—	—	—
Кобальт	мкг%	3,0—5,0	3,0—5,0	2,5—5,0	2,5—5,0	2,5—5,0	—
Марганец	мкг%	15—25	2—8	2—10	—	—	—
Медь	мкг%	90—110	60—100	—	35—45	75—95	—
Скорость оседания эритроцитов по Панченкову	мм/ч	0,5—1,5	0,5—1,5	2—9	40—70	—	—
Цинк	мкг%	300—500	80—100	400	—	—	—
			Сыворотка крови				
Аскорбиновая кислота (витамин С)	мг%	0,6—1,5	0,4—0,8	0,2—1,2	0,2—1,5	—	—
Белок общий	г/л	72—86	65—75	70—85	70—78	55—75	57—79
альбумины	%	38—50	40—55	35—45	35—45	48—57	—
	г/л	—	—	—	—	25,8—39,7	24,5—37,5
α-глобулины	%	12—20	13—20	14—20	14—18	10—16	—
β-глобулины	%	10—16	7—11	16—21	20—26	20—25	—
γ-глобулины	%	25—40	20—46	17—26	18—24	10—14	—
Билирубин общий	мг%	0,01—0,3	0,01—0,3	0,08—0,3	0,8—1,6	0,51—1,1	0,58—1,16
	мкмоль/л	0,2—5,1	0,2—5,1	1,4—5,1	13,7—27,4	8,8—18,8	10—20

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
Железо	мкг%	100—160	100—150	100—180	—	100—120	—
Йод, связанный с белком (СБЙ)	мкг%	4—8	4—8	4—6	2—4	—	—
Кальций общий	мг%	10—12,5	10—12,5	10—14	10—14	8,5—10,5	8,0—10,8
	ммоль/л	2,5—3,13	2,5—3,13	2,5—3,5	2,5—3,5	2,12—2,68	2,0—2,7
Каротин в пастбищный период	мг%	0,9—2,8	—	—	—	—	—
Каротин в стойловый период	мг%	0,4—1,0	—	—	—	—	—
Креатинин	мг%	0,45—0,65	0.6—1.1	0,7—1,9	0,9—1,8	0,5—1,7	0,5—1,7
	мкмоль/л	39,6—57,2	53—97	62—167	79—158	44—138	49—165
Триглицериды	мг%	20—50	60—80	20—80	—	—	—
	ммоль/л	0,22—0,60	0,66—0,88	0,22—0,88	—	—	—
Медь	мкг%	80—120	—	200	—	—	—
Молочная кислота	мг%	9—13	9—11	9—11	5—13	13,0—28,8	16,8—29,6
	ммоль/л	0,99—1,43	0,99—1,21	0,99—1,21	0,56—1,44	1,43—3,17	1,85—3,25
Магний	мг%	2—3	2—3	2,5—3,5	2,0—3,5	1,7—2,6	1,9—2,9
	ммоль/л	0,82—1,23	0,82—1,23	1,03—1,44	0,82—1,44	0,7—1,1	0,8—1,2
Мочевина	мг%	20—40	20—35	20—35	20—35	18,6—55,2	33—66
	ммоль/л	3,3—6,7	3,3—5,8	3,3—5,8	3,3—5,8	3,1—9,2	5,5—11,1
НЭЖК	мг%	3—15	—	8—20	—	—	—
Пировиноградная кислота	мг%	0,8—1,7	0,8—1,7	0,6—1,3	—	—	—
	мкмоль/л	114—193	114—193	68—148	—	—	—
Ретинол в стойловый период	мкг%	24—80	—	—	—	—	—
Ретинол в пастбищный период	мкг%	40—150	—	—	—	—	—
Селен	мкг/100 мл	0,3—0,9	—	—	—	—	—
Токоферол	мг%	—	—	0,2—0,75	—	—	—
Фосфор неорганический	мг%	4,5—6,0	4,5—6,0	4,0—6,0	4,2—5,5	3—6	4,75
	ммоль/л	1,45—1,94	1,45—1,84	1,29—1,94	1,35—1,78	1,0—2,0	1,3—2,4

Продолжение

1	2	3	4	5	6	7	8
Холестерин общий	мг%	50—170	60—140	60—110	55—100	116—255	70—162
	ммоль/л	1,30—4,42	1,56—3,64	1,56—2,86	1,43—2,60	3,0—6,6	1,8—4,2
Цинк	мкг%	100—150	100—200	100—160	—	70—120	—
				Плазма крови			
Натрий	мг%	320—340	320—340	320—340	310—350	—	—
	ммоль/л	139—148	139—148	139—148	135—143	140—154	146—159
Калий	мг%	16—19	16—19	16—19	19—22	3,8—5,6	3,8—5,3
	ммоль/л	4,10—4,86	4,10—4,86	4,86—5,63	4,86—5,89	—	—
Щелочной резерв	об.% CO_2	46—66	48—60	45—55	50—65	55—65	—
	ммоль/л	19—27	20—25	18,5—23	21—27	18—24	16,4—22,0

6. Нормативы показателей крови телят

Показатель	Возраст			
	1—5 дней	10—15 дней	1 мес	3 мес
		Кровь		
pH	7,38—7,41	7,35—7,41	7,38—7,45	7,40—7,42
Гематокрит, %	35—37	36—37	37—38	38—40
Эритроциты, 10^{12}/л	7,4—8,4	6,4—6,8	8,2—8,6	7,8—8,0
Лейкоциты, 10^9/л	7,1—12,1	9,3—12,5	8,2—8,6	9,3—10,0
Гемоглобин, г/л	105—109	90—126	109—113	112—128
Глюкоза, ммоль/л	4,5—5,0	4,2—4,4	—	3,2—3,6
		Сыворотка (плазма) крови		
Общий белок, г/л	56,9—60,5	56,5—59,1	61—63	62—66
Резервная щелочность об.% CO_2	54—56	52—54	50—54	53—55
Мочевина, ммоль/л	2,4—3,6	3,6—3,7	—	—
Билирубин, мкмоль/л	4,7—8,2	2,6—3,4	—	—
Кальций общий, ммоль/л	2,7—3,2	2,6—2,7	—	2,7—3,0
мг %	10,8—12,8			
Фосфор неорганический				
ммоль/л	4,8—7,4	4,5—6,8	—	5,88—6,0
мг%	1,5—2,3	1,4—2,2	—	1,9—2,0
Магний, ммоль/л	1,3—1,4	1,3—1,4	1,2—1,3	1,2—1,3
Витамин А, мкмоль/л	1,4	1,4	1,4	1,4

7. Нормативы показателей крови ягнят

Показатель	Возраст			
	1 день	14 дней	1 мес	4—6 мес
	Кровь			
Эритроциты, 10^{12}/л	9—10,2	6,5—8,7	8,4—9,8	9,2—12,2
Лейкоциты, 10^{9}/л	4—7	5—6,5	5,2—8,0	6,1—10,4
Гематокрит, %	35—36	36—37	37—38	38—40
Гемоглобин, г/л		100—120	94—113	92—122
Глюкоза, ммоль/л	5,5—5,8	4,9—5,2	4,1—4,7	2,9—3,4
	Сыворотка крови			
Общий белок, г/л	46—54	64—59	60—62	62—71
Резервная щелочность (плазма) об.% CO_2	49—56	50—55	50—56	46—60

8. Коэффициенты перевода единиц измерения активности ферментов

Единица измерения	Коэффициент	Единица измерения
мккат/л	60	Ед/л
нкат/л	0,06	Ед/л
Ед/л	0,0167	мккат/л
Ед/л	16,67	нкат/л

Для определения каталитической активности ферментов в 1972 г. введена единица катал, соответствующая системе СИ. Катал (символ кат) — это каталитическая активность, или то количество фермента, которое способно катализировать реакцию со скоростью равной 1 молю в 1 с в заданной системе измерения активности. Каталитическая активность в 1 катал для практического применения слишком большая величина, поэтому каталитическую активность рекомендовано выражать в микрокаталах (мккат), нанокаталах (нкат), пикокаталах (пкат), чему способствуют скорости реакции, выражающейся в микромолях, наномолях, пикомолях в 1 с.

Ферментная единица (Е или V) имеет с каталом такое соотношение: 1 Е (или V) фермента катализирует реакцию со скоростью 1 мкмоль/мин = 1/60 микромоль/с = 16,67 нмоль/с. Таким образом, 1 Е (или V) соответствует 16,67 нкат, т. е. катализирует реакцию со скоростью 16,67 нмоль/с.

Катал как единица не нашла широкого применения. Чаще берут 1 мкмоль (нмоль, пмоль) субстрата за 1 мин, реже за 1 с, еще реже за 1 ч. Например, нормальная величина активности в сыворотке крови АсАТ до 127 нмоль/с.л, или до 40 ед.

Источники:

1. Виноградова Р. П. Единицы измерения активности ферментов // Лабораторная диагностика, №. 2, 2002. — С. 36—39.

2. Клиническая лабораторная аналитика / Под ред. В. В. Меньшикова — М.: Агат-Мед, 2002. Том 1. — С. 51.

9. Биохимические показатели молозива и молока здоровых коров

Показатель	Молоко	Молозиво					
		1-го удоя	1-го дня	2-го дня	3-го дня	4-го дня	5-го дня
Кислотность, °Т	16—19		40,0	33,0	27,3	23,1	21,6
Кетоновые тела, мг%	4—8	2—6	—	—	—	—	6—8
Каротин, мкг%	8—28	110—400	—	—	—	—	—
Магний, мг%	11—15	25—33	—	—	—	—	15—17
Мочевина, мг%	20—40	15—20	—	—	—	—	18—24
Кальций общий, мг%	125—130	260—180	235—152	183—147	181—141	176—140	168—90,0
Белок общий,%	2,7—5,0	22,5	14,8	9,4	5,8	4,0	3,9
Ретинол, мкг%	13—3,5	150—580	—	—	—	—	—
Сахар молочный, %	4,0—5,6	—	3,0	3,6	3,9	4,1	4,1
Токоферол, мкг%	8—10	—	—	—	—	—	—
Фосфор неорганический, мг%	60—65	152—96	160—90	128—80	109—70	97—69	—
pH	6,3—6,5	—	—	—	—	—	—
Натрий, мг%	36—63	—	—	—	—	—	—
Калий, мг%	140—180	—	—	—	—	—	—
Количество соматических клеток, тыс/мл	Не более 400 в сборном молоке высшего сорта и не более 500 в молоке от индивидуального животного						
Нитраты, мг/кг	Не более 10						

10. Константы биохимических показателей содержимого рубца (взрослые животные)

Показатель	Крупный рогатый скот	Овцы
Сухое вещество в цельном содержимом рубца, %	3,50—5,50	4,00—9,37
Сухое вещество в рубцовой жидкости, %	1,96—3,20	2,00—4,66
pH	6,0—7,3	6,2—7,3
Летучие жирные кислоты, ммоль/100 мл	6,0—14,0	5,0—15,0
Соотношение кислот, молярный %:		
уксусная	55,0—70,0	55,0—65,0
пропионовая	15,0—20,0	15,0—22,0
изомасляная	0,6—1,5	0,5—1,5
масляная	10,0—15,0	10,0—15,0
изовалериановая	1,0—3,0	1,0—3,0
валериановая	1,0—3,0	1,0—4,0
капроновая	0—1,2	0—1,2
Азот, мг%:		
общий в цельном содержимом	100—300	120—350
общий в рубцовой жидкости	50—240	60—250

Продолжение

Показатель	Крупный рогатый скот	Овцы
небелковый	15—60	10—50
белковый	35—200	40—240
аммонийный	5—20	5—30
Аммиак, мг%	6,5—25,0	6,5—35,0
Азот нитрата, мг%	0,017—0,054	0,012—0,090
Азот нитрита, мг%	0,010—0,016	0,005—0,008
Молочная кислота, ммоль/100 мл	Следы—0,20	Следы—0,15
Редуцирующие сахара, мг%	0—50,0	1,0—50,0
Общие липиды, мг%	100—400	100—450
Количество бактерий в мл	10^9—10^{10}	10^9—10^{10}
Количество простейших, тыс. в 1 мл	200—1200	250—1800
Газы рубца, %:		
CO_2	50—70	50—70
CH_4	20—40	20—35
$O_2 + N_2$	5—15	5—10

11. Перевод значений pNO_3 в массовую долю нитратов, мг/кг, при анализе вытяжек из картофеля и свеклы (Н : У = 1:5)

pNO_3	Сотые доли pNO_3									
	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
1,6	9033	8827	8626	8430	8238	8050	7867	7688	7513	7342
1,7	7175	7012	6852	6696	6544	6375	6249	6107	5968	5832
1,8	5699	5570	5443	5319	5198	5079	4964	4851	4740	4633
1,9	4527	4424	4323	4225	4129	4035	3943	3853	3765	3680
2,0	3596	3514	3434	3356	3280	3205	3132	3061	2991	2923
2,1	2856	2791	2728	2666	2605	2546	2488	2431	2376	2322
2,2	2269	2217	2167	2117	2069	2022	1976	1931	1887	1844
2,3	1802	1761	1721	1682	1644	1606	1570	1534	1499	1465
2,4	1432	1399	1367	1336	1306	1276	1247	1218	1191	1164
2,5	1137	1111	1086	1061	1037	1013	990	968	946	924
2,6	903	883	863	843	824	805	787	769	751	734
2,7	717	701	685	670	654	639	625	611	597	583
2,8	570	557	544	532	520	508	496	485	474	463
2,9	453	442	432	422	413	403	394	385	377	368
3,0	366	351	343	336	328	320	313	306	299	292
3,1	286	279	273	267	261	255	249	243	238	232
3,2	227	222	217	212	207	202	198	193	189	184
3,3	180	176	172	168	164	161	157	153	150	146
3,4	143	140	137	134	131	128	125	122	119	116
3,5	114	111	109	106	104	101	99	97	95	92
3,6	90,3	88,3	86,3	84,3	82,4	80,5	78,7	76,9	75,1	73,4
3,7	71,7	70,1	68,5	67,0	65,4	63,9	62,5	61,1	59,7	58,3
3,8	57,0	55,7	54,4	53,2	52,0	50,8	49,6	48,5	47,4	46,3
3,9	45,4	44,2	43,2	42,2	41,3	40,3	39,4	38,5	37,7	36,8
4,0	36,0	35,1	34,3	33,6	32,8	32,0	31,3	30,6	29,9	29,2

12. Перевод значений pNO_3 в массовую долю нитратов, мг/кг, при анализе вытяжек из капусты, моркови, томатов, огурцов, дыни, арбузов, тыквы, зеленных культур (Н: У = 1:5)

pNO_3	Сотые доли pNO_3									
	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09
1,6	9188	8979	8775	8575	8380	8189	8003	7821	7643	7469
1,7	7299	7133	6970	6812	6656	6505	6357	6212	6071	5933
1,8	5798	5666	5537	5411	5287	5167	5049	4935	4822	4712
1,9	4605	4500	4398	4298	4200	4104	4011	3920	3830	3743
2,0	3653	3575	3493	3414	3336	3260	3186	3113	3043	2973
2,1	2906	2840	2775	2712	2650	2590	2531	2473	2417	2362
2,2	2308	2256	2204	2154	2105	2057	2010	1964	1920	1876
2,3	1833	1792	1751	1711	1672	1634	1597	1560	1525	1490
2,4	1456	1423	1391	1359	1328	1298	1268	1239	1211	1184
2,5	1157	1130	1105	1080	1055	1031	1007	985	962	940
2,6	919	898	877	858	838	819	800	782	764	747
2,7	730	713	697	681	666	650	636	621	607	593
2,8	580	567	554	541	529	517	505	493	482	471
2,9	461	450	440	430	420	410	401	392	383	374
3,0	366	357	349	341	334	326	319	311	304	297
3,1	291	284	277	271	265	259	253	247	242	236
3,2	231	226	220	215	210	206	201	196	192	188
3,3	183	179	175	171	167	166	163	156	152	149
3,4	146	142	139	136	133	130	127	124	121	118
3,5	116	113	110	108	105	103	101	98	96	94
3,6	91,9	89,8	87,7	85,8	83,8	81,9	80,0	78,2	76,4	74,7
3,7	73,0	71,3	69,7	68,1	66,6	65,0	63,0	62,1	60,7	59,3
3,8	58,0	56,7	55,4	54,1	52,9	51,7	50,5	49,3	48,2	47,1
3,9	46,1	45,0	44,0	43,0	42,0	41,0	40,1	39,2	38,3	37,4
4,0	36,6	35,7	34,9	34,1	33,4	32,6	31,9	31,1	30,4	29,7

13. Физические свойства растворителей

Растворитель	ε (25 °C)	$\mu \cdot 10^{-30}$, Кл · м (в бензоле)	n_D^{20}	Растворитель	ε (25 °C)	$\mu \cdot 10^{-30}$, Кл · м (в бензоле)	n_D^{20}
Вода	78,5	6,0	1,3330	Ацетон	20,7	9,0	1,3588
Формамид	109,5	11,4	1,4475	Дихлорэтан	10,4	5,7	1,4448
N-метилформамид	182,4	12,7	1,4310	Метилэтилкетон	18,5	9,0	1,3785
Диметилформамид	36,7	12,7	1,4269	Циклогексанон	18,3	9,7	1,4522
Диметилсульфоксид	48,9	13,0	1,4783	Пиридин	12,3	7,3	1,5092
				Хинолин	9,0	7,3	1,6268

Продолжение

Растворитель	ε (25 °C)	$\mu \cdot 10^{-30}$, Кл · м (в бензоле)	n_D^{20}	Растворитель	ε (25 °C)	$\mu \cdot 10^{-30}$, Кл · м (в бензоле)	n_D^{20}
Сульфолан	44,0	16,0	1,4817	Хлороформ	4,7	3,7	1,4433
Диметилацетамид	37,8	12,7	1,4351	Уксусная кислота	6,2	5,0	1,3721
Ацетонитрил	37,5	11,7	1,3442	Этилацетат	6,0	6,0	1,3724
Нитробензол	34,8	13,4	1,5525	1,4-Диоксан	2,2	1,3	1,4224
Этиленгликоль	37,7	6,7	1,4318	Диэтиловый эфир	4,2	4,0	1,3526
Метанол	32,6	5,3	1,3285	Бензол	2,3	0	1,5011
Этанол	24,3	5,7	1,3611	Толуол	2,4	1,3	1,4969
Пропанол	20,1	5,7	1,3853	Сероуглерод	2,6	0	1,6255
Бутанол	17,1	5,7	1,3992	Четыреххлористый углерод	2,2	0	1,4603
Изопропанол	18,3	5,7	1,3771				
Изопентанол	14,7	5,7	1,4053	Гексан	1,9	0	1,3749

Для характеристики полярных свойств растворителей обычно используют величину диэлектрической проницаемости ε, которая описывает влияние растворителя на взаимодействие электрических зарядов друг с другом. По этому признаку различают растворители: полярные — $\varepsilon > 30$, обладают диссоциирующим действием; малополярные — $\varepsilon = 10—30$, со слабым диссоциирующим действием; неполярные — $\varepsilon < 10$, не оказывают диссоциирующего эффекта.

Электрические свойства растворителей характеризуют также их электрические моменты диполей μ, которые описывают расстояние между противоположными зарядами в молекуле растворителя. Растворители с постоянным электрическим моментом диполя называют *диполярными* растворителями в противоположность *аполярным*, т. е. лишенным, постоянного электрического момента диполя.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ (ИСТОЧНИКИ)

1. **Антов С. Н., Газдаров В. М.** Модификация методики определения протеиновой активности в химусе и слизистой кишечника. Бюл. ВНИИ физиологии, биохимии и питания с.-х. животных. Вып. 1 (48). — Боровск, 1978. — С. 76—78.
2. **Аникеева С. П.** Клеточные стабилизации свободных SH-групп восстановленного глутатиона // Лаб. дело. — 1967. № 9. — С. 564.
3. **Антонов М. П., Антонова Л. А., Пашутина Т. В.** Особенности определения активности церулоплазмина с п-фенилендиамином в качестве субстрата // Лаб.дело, 1985, № 6. — С. 335—338.
4. **Архипов А. В.** Научные труды МВА, 1973, Т. 71. — С. 137—142.
5. **Архипов А. В.** Научные труды МВА, 1980, Т. 119. — С. 100—104.
6. **Архипов А. В., Антонов А. А.** Изучение липидов и липидного обмена у сельскохозяйственных животных с применением тонкослойной и газожидкостной хроматографии // Методические рекомендации. ВАСХНИЛ. — М., 1979. — 41 с.
7. **Балаховский С. Д., Балаховский М. С.** Методы химического анализа крови. — М.: Мир, 1959.
8. **Биохимические** методы исследования в клинике / Под ред. А. А. Покровского. — М:. Медицина, 1969. — 652 с.
9. **Блинов Н. И.** Методические рекомендации по определению неспецифической резистентности у новорожденных телят. — М.: МВА, 1982.
10. **Бузлама В. С. и др.** Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных. РАСХН. — Воронеж, 1992. — С. 23—27.
11. **Бузлама В. С.** Методическое пособие по изучению процессов перекисного окисления липидов и системы антиоксидантной защиты организма животных. РАСХН. — Воронеж, 1997.
12. **Волков Д. Т.** Новые методы и модификации биохимических исследований в животноводстве. — М.: МВА, 1970. — С. 66.
13. **Воскресенский П. И.** Техника лабораторных работ. — Л.: Химия, 1973.
14. **Высокочувствительный** метод определения селена в биологических материалах: Методические рекомендации/ И. И. Назаренко, Л. А. Фролова, Л. А. Леонова и др. — М.: МВА, 1982.
15. **Геккелер К., Экштайн Х.** Аналитические и препаративные лабораторные методы: Справочник. — М.: Химия, 1994. — С. 416.
16. **Герасимов И. Г., Плаксина Е. Н.** Неферментативное определение лактата и пирувата в одной пробе крови // Лабораторная диагностика, 2000, № 2. — С. 46—47.
17. **Гимерих Ф. И.** К определению глутатиона крови // Лаб. дело, 1967, № 9. — С. 564.
18. **Двинская Л. М., Никифорова Л. Н.** Определение переокисления липидов ткани // Изучение липидного обмена у сельскохозяйственных животных. — Боровск, 1980. — С. 37—40.
19. **Делекторская Л. Н., Добрянская Л. Д.** В кн.: Унифицированные методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В. В. Меньшикова. — М., 1974, вып. VI. — С. 5—18.
20. **Дослідження** крові тварин та клінічна інтерпретація отриманих результатів / В. І. Левченко, В. М. Соколюк, В. М. Безух та ін. — Біла Церква, 2002.
21. **Жирорастворимые** витамины и методы их определения в биологических субстратах //Методические указания. — Боровск, 1979. — С. 68—69.
22. **Захаров Л. Н.** Начала техники лабораторных работ. — Л.: Химия, 1981.
23. **Захаров Л. Н.** Техника безопасности в химических лабораториях: Справочник. 2-е перераб. и доп. изд. — Л.: Химия, 1991. — 336 с.
24. **Зоотехнический** анализ кормов / Е. А. Петухова, Р. Ф. Бессарабова, Л. Д. Холенева и др. — 2-е изд., доп. и переработ. — М.: Агропромиздат, 1989. — 239 с.

25. **Изучение** пищеварения у жвачных: Методические указания / Н. В. Курилов, Н. А. Севастьянов, В. Н. Коршунов и др. — Боровск, 1975. — С. 17—18.

26. **Кармалиев Р. Х.** Биохимические процессы при свободнорадикальном окислении и антиоксидантной защите. Профилактика окислительного стресса у животных // С.-х. биология, 2002, № 2. — С. 19—28.

27. **Клиническая** лабораторная аналитика. Том 1 / Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Агат-Мед, 2002. — С. 115—164.

28. **Клиническая** лабораторная аналитика / Под ред. В. В. Меньшикова. Том 3. — М.: Лабпресс, 2000. — 384 с.

29. **Клиническая** лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. — М.: Агропромиздат, 1985. — 287 с.

30. **Клиническая** диагностика внутренних незаразных болезней животных / А. М. Смирнов, П. Я. Конопелько, Р. П. Пушкарев и др. — М.: Агропромиздат, 1988. — 512 с.

31. **Клінічна** діагностика хвороб тварин / В. І. Левченко, М. О. Судаков, Й. Л. Мельник та ін.; за ред. В. І. Левченка. — Киев: Урожай, 1995. — 368 с.

32. **Колб В. Г., Камышников В. С.** Клиническая биохимия. — Минск: «Белорусь», 1976.

33. **Колб В. Г., Камышников В. С.** Справочник по клинической биохимии. — Минск: «Белорусь», 1982. — 366 с.

34. **Кондрахин И. П.** Диффузный метод определения резервной щелочности крови // Ветеринария, 1978, № 12. — С. 94—97.

35. **Кондрахин И. П.** Методика диагностики и прогнозирования бронхопневмонии телят по биохимическому тесту // Ветеринария, № 12, 1997. — С. 43—44.

36. **Кондрахина К. Н.** Морфология клеток молока (секрета) у здоровых и больных лейкозом коров // Автореф. дисс. канд. вет. наук. — М., 1975.

37. **Колина В. В., Филимкович И. В., Романцева Е. Ф.** Исследование распада смешанных дисульфидов // Вопр. мед. химии. — 1976, № 4, — С. 528 — 532.

38. **Конопкайте С. И.** Коламины. — Вильнюс: «Моколае», 1978.

39. **Коромыслов В. Ф., Кудрявцева А. А.** Экспресс-метод определения каротина в плазме крови // Ветеринария, № 2, 1973. — С. 108; № 10, 1972. — С. 119.

40. **Кроткова А. П., Митин Н. И.** Определение летучих жирных кислот в содержимом рубца у жвачных животных // Вестник с.-х. науки. — 1957. — № 10. — С. 13—17.

41. **Кругляков Г. О., Штутман И. М.** Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печени крыс после введения селенита натрия // Укр. биохимический журнал, 1976, № 2. — С. 203—207.

42. **Кузнецов С. Г.** Ветеринария, 1973, № 7. — С. 103—105.

43. **Лабораторные** методы исследования в клинике: Справочник / Меньшиков В. В., Делекторская Л. Н., Золотницкая Р. П. и др.; Под ред. В. В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.

44. **Лабораторные** исследования в ветеринарии: Справочник / Под ред. Б. И. Антонова. — М.: Агропромиздат, 1991. — С. 27—28.

45. **Лукичева Т. И., Сентебова Н. А.** Лаб. дело. — 1977, № 11. — С. 675—677.

46. **Лурье Ю. Ю.** Справочник по аналитической химии: Справочник, 6-е перераб. и доп. изд. — М.: Химия, 1989. — С. 448.

47. **Макаревич О. П., Голиков П. П.** Активность супероксиддисмутазы в крови в острый период различных заболеваний // Лаб. дело. — 1983, № 6. — С. 24—27.

48. **Методические** рекомендации. Определение содержания пировиноградной кислоты по модифицированному методу Фридмана и Хаугена. — М.: ЦОЛИУ врачей, 1976.

49. **Методические** рекомендации по химическим и биохимическим исследованиям в зоотехнии. — Дубровицы, 1975. — С. 71—74.

50. **Методические** указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований. — М.: МЗ СССР, 1977.
51. **Методические** указания по определению азота нитратов и нитритов в почвах, природных водах, кормах и растениях. — М.: ЦИНАО, 1981. — С. 42—50.
52. **Методические** указания по применению унифицированных и биохимических методов исследования крови, мочи и молока в ветеринарных лабораториях. — М.: МСХ СССР, 1981.
53. **Микрометод** ускоренного определения концентрации аммиака в рубцовой жидкости // Научно-технический бюллетень УНИИФ и Б с.-х. животных / Г. И. Калачнюк, О. Г. Савка, Я. Копчены и др. 1981. — Вып. 3 (3). — С. 24—25.
54. **Назаренко И. И., Кислова И. В.** Высокочувствительный метод определения миграционных форм селена в природных водах // Лабораторные и технологические исследования и обогащение минерального сырья. Экспресс-информация, 1977, № 6. — С 1—8.
55. **Об унификации** клинических лабораторных методов исследования. — М.: МЗ СССР, 1981. — С. 42—45.
56. **Определение** витаминов в биологических материалах // Методические рекомендации. — Львов, 1978.
57. **Орлов Л. В.** В кн.: Изучение липидного обмена у с.-х. животных. — Боровск, 1980. — С. 34—36.
58. **Основы** аналитической химии / Под ред. акад. Ю. А. Золотова. — М.: Высшая школа, 2002. — Кн. 1 — 351 с., Кн. 2 — 494 с.
59. **Оценка** качества кормов, органов, тканей, яиц и мяса птицы // Методическое руководство для зоотехнических лабораторий. ПНИТИП. — Сергиев Посад, 1998.
60. **Петрова А. Т., Абрамова Т. К.** Модифицированные методы определения витамина С // Ветеринария, 1979. — № 2. — С. 74—75.
61. **Правдин П. В.** Лабораторные приборы и оборудование из стекла и фарфора: Справочник. — М.: Химия, 1988. — 336 с.
62. **Рабинович В. А., Хавин В. Я.** Краткий химический справочник, 3-е перераб. и доп. изд. — Л.: Химия, 1991. — 432 с.
63. **Розенберг П. А., Бялко Н. К.** Химические методы исследования биологических субстратов в профпатологии. — М., 1969.
64. **Руководство** по клиническим лабораторным исследованиям / Под ред. Е. А. Кост и Л. Г. Смирновой. — М.: Медицина, 1964. — С. 236—238.
65. **Руководство** по контролю качества кормов и полноценности кормления животных /Аликаев В. А. Петухова Е. А, Халенева Л. Д и др. — М.: Колос, 1967. — С. 269—284.
66. **Сычевский М. Е., Кольцов А. В., Титков А. А.** Проблемы нитратного азота в растениях. — Симферополь, 1997. — С. 28—42.
67. **Титов В. Н., Творогова Т. Г.** Клиническая лабораторная диагностика. № 3, 1995. — С. 15—18.
68. **Тодоров Й.** Клинические лабораторные методы в педиатрии. — София, 1968. — 777 с.
69. **Токарская З. Б.** Лаб. дело. — 1971. — С. 24—27.
70. **Тэн Э. В.** Экспресс-метод определения активности церулоплазмина в сыворотке крови // Лаб. дело. — 1985, № 6. — С. 334—335.
71. **Хоменко В. И.** Гигиена получения и ветсанэкспертизы молока по государственному стандарту. 3-е изд. — Киев: «Урожай», 1990. — С. 337—338.
72. **Хроматография** в тонком слое / Под ред. Э. Шталя. — М.: «Мир», 1965.
73. **Чеботарева Н. А.** Химия в сельском хозяйстве, № 9. — 1977. — С. 50—52.
74. **Черняускене Р. Ч., Варшкявичене З. З., Грибаускас П. С.** // Лаб. дело. — 1984, № 6. — С. 362—365.
75. **Экспериментальная** витаминология / Под ред. Ю. М. Островского. — Минск: «Наука и техника», 1979. — С. 44—45.
76. **Эмануэль В. Л.** Клиническая лабораторная диагностика. — Киев, 1997, № 10. — С. 23—34.
77. **Королюк М. А.** и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988, № 1. — С. 16—19.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение. *И. П. Кондрахин* 3

ГЛАВА 1. ФИЗИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРИНЦИПЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АППАРАТУРЫ В ЛАБОРАТОРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ. *В. Э. Новиков* 5

1.1. Колориметры 6
1.2. Спектрофотометры 8
1.3. Флюориметры (люминометры) 9
1.4. Пламенные фотометры 10
1.5. Атомно-абсорбционные спектрофотометры 11
1.6. Поляриметры 12
1.7. Рефрактометры 13
1.8. Анализаторы соматических клеток молока 14
1.9. Приборы иммунологических методов исследования 14
1.10. Основные правила установки и эксплуатации приборов 15
1.11. Правила безопасности при эксплуатации приборов и оборудования 16

ГЛАВА 2. ПОДГОТОВКА ПОСУДЫ И РЕАКТИВОВ. *Л. А. Фролова* 17

2.1. Подготовка посуды к анализам 17
2.2. Применение реактивов и их очистка 19
2.3. Приготовление и хранение точных растворов 23
2.3.1. Способы выражения концентрации растворов 24
2.3.2. Расчеты при приготовлении молярных растворов 30
2.3.3. Расчеты при приготовлении нормальных растворов 31
2.3.4. Приготовление растворов с заданной массовой долей веществ . . . 32
2.4. Титрование растворов 34
2.5. Приготовление буферных смесей, колонок, силикагельных пластинок 37
2.6. Правила безопасности при работе с реактивами, правила их хранения 39
2.7. Помощь при ожогах и отравлении 42

ГЛАВА 3. ЛАБОРАТОРНЫЕ КЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ. *И. П. Кондрахин, А. В. Архипов* 43

3.1. Отбор и подготовка образцов крови к анализу *И. П. Кондрахин* 43
3.2. Методы общего клинического анализа крови *И. П. Кондрахин* 48
Подсчет эритроцитов в камере Горяева (48). Подсчет лейкоцитов в камере Горяева (49). Дифференциальный подсчет лейкоцитов (лейкограмма) (52). Определение гематокрита с помощью микроцентрифуги (60). Определение гематокрита с использованием пипеток Панченкова или градуированных (60). Определение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) микрометодом Панченкова (60). Определение гемоглобина крови гемиглобинцианидным методом (62). Определение цветового (цветного) показателя (63).
3.3. Биохимические методы исследования крови. *И. П. Кондрахин* 64
3.3.1. Методы определения кислотно-основного равновесия (КОР) . . . 66
3.3.2. Определение резервной щелочности в плазме крови диффузным методом по И. П. Кондрахину 67

3.3.3. Методы оценки состояния водно-электролитного и минерального обменов 70
Определение калия и натрия в биологических жидкостях методом пламенной фотометрии (70). Определение натрия и калия в биологических жидкостях с использованием ионоселективных анализаторов (75). Методы определения кальция, фосфора, магния (75). Определение общего кальция в сыворотке крови комплексонометрическим методом с индикатором флуореконом (по Вичеву, Каракашеву) (76). Определение общего кальция в сыворотке крови комплексоном Арсеназо III (77). Определение общего кальция в сыворотке крови с индикатором мурексидом (79). Определения кальция в костной ткани (80). Определение ионизированного кальция расчетным методом (по И. Тодорову) (80). Определение ионизированного кальция с применением обменной адсорбции (по Д. Т. Волкову) (81). Определение неорганического фосфора в сыворотке крови с ванадат-молибденовым реактивом (по Пулсу в модификации В. Ф. Коромыслова и Л. А. Кудрявцевой) (82). Определение неорганического фосфора в сыворотке крови животных с аскорбиновой кислотой (84). Определение магния в сыворотке (плазме) крови по цветной реакции с титановым желтым (по Кункелю, Пирсону, Швейгерту в модификации И. В. Петрухина) (86).
3.3.4. Методы оценки состояния белкового обмена 88
Определение общего белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом (89). Определение общего белка в сыворотке крови по биуретовой реакции (91). Определение белковых фракций в сыворотке крови (94). Определение альбумина в сыворотке крови по реакции с бромкрезоловым зеленым (94). Определение иммуноглобулинов в сыворотке крови по реакции с натрия сульфитом (95). Определение иммунных белков в сыворотке крови по реакции с цинка сульфатом (цинк-сульфатный тест — ЦСТ) (95). Определение белковых фракций в сыворотке крови турбидиметрическим (нефелометрическим методом) (97). Определение мочевины в сыворотке крови по цветной реакции с диацетилмонооксимом (100). Определение свободного аминного азота в сыворотке крови по методу Г. А. Узбекова в модификации З. С. Чулковой (102). Определение мочевой кислоты в сыворотке крови по реакции с фосфорно-вольфрамовым реактивом (104).
Определение мочевой кислоты в сыворотке крови животных с использованием заводского набора реактивов (106). Определение креатинина в сыворотке крови по цветной реакции Яффе (метод Лоппера) (107). Определение билирубина в сыворотке крови по диазореакции (метод Ендрассика—Клегторна—Грофа) (109). Определение билирубина в сыворотке крови животных по методу Ендрассика—Клегторна—Грофа в модификации В. И. Левченко и В. В. Влизло (112). Коллоидно-осадочные пробы (113). Сулемовая проба (114). Цинк-сульфатные осадочные пробы (114). Цинк-сульфатная осадочная печеночная проба (по И. П. Кондрахину) (115). Цинк-сульфатный бронхолегочный тест (цинк-сульфатная осадочная проба) (по И. П. Кондрахину) (115).
3.3.5. Методы оценки состояния углеводного обмена. 117
Определение глюкозы в крови, моче по цветной реакции с орто-толуидином (117). Определение глюкозы в безбелковом фильтрате крови по Сомоджи (119). Определение пировиноградной кислоты по модифицированному методу Фрeедмана и Хаугена (122). Определение молочной кислоты по реакции с параоксидифенилом (124). Метод неферментативного определения лактата и пирувата в одной пробе крови (125). Определение сиаловых кислот в сыворотке крови по реакции с резорцином (127). Определение кетоновых тел в крови йодометрическим методом (128). Экспресс-метод обнаружения ацетоновых тел в сыворотке (плазме) крови (132).
3.3.6. Методы оценки состояния липидного обмена. *А. В. Архипов*. . . . 133
3.3.6.1. Выделение липидов из биологических субстратов 134
Метод экстракции липидов хлороформ-метаноловой смесью (по Фолчу) (134). Метод экстракции липидов спиртово-эфирной смесью (по

Блюру) (136). Определение общих липидов в сыворотке крови с сульфофосфованилиновым реактивом (по Цёлнеру—Киршу в изложении Л. В. Орлова) (137).
3.3.6.2. Количественное определение классов липидов химическими методами 139
Определение содержания фосфолипидов (по Бартлетту—Ушеру) (139). Определение содержания триацилглицеринов (по Сардесаю и Маннингу) (141). Определение содержания неэтерифицированных жирных кислот (НЭЖК) в сыворотке (плазме) крови (по Лауреллу и Тибблингу) (144). Определение содержания общего холестерина в сыворотке крови (145). Определение содержания этерифицированного холестерина в сыворотке крови (по Балаховскому) (146). Определение содержания β-липопротеидов в сыворотке (плазме) крови (по Бурштейну в модификации Виноградовой) (148).
3.3.6.3. Разделение липидов на классы методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) 150
3.3.6.4. Количественное определение классов липидов инструментальным методом 155
3.3.6.5.Определение жирнокислотного состава липидов методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) 157
3.3.7. Методы определения продуктов перекисного (свободнорадикального) окисления липидов. *А. В. Архипов* 166
Определение диеновых конъюгатов и кетодиенов полиненасыщенных жирных кислот в крови (168). Определение малонового диальдегида в крови (169). Определение флуоресцирующих оснований Шиффа (171).
3.3.8. Методы определения показателей системы антиоксидантной защиты организма. *А. В. Архипов* 172
Определение активности супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) в эритроцитах (172). Определение активности каталазы (КФ 1.11.1.6) в крови (175). Определение активности пероксидазы (КФ 1.11.1.7) в крови (176). Определение активности глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) в крови (178). Определение активности глутатионредуктазы (КФ 1.6.4.2) в крови (180). Определение восстановленного глутатиона в крови (181). Определение витамина Е в сыворотке крови (183). Определение церулоплазмина в сыворотке крови (183). Определение антиокислительной активности (АОА) плазмы крови (184).
3.3.9. Методы определения витаминов. *И. П. Кондрахин* 186
Определение витамина А и каротина в сыворотке крови по Бессею в модификации В. И. Левченко и сотр. (186). Определение каротина в сыворотке (плазме) крови по Кари и Прейсу в модификации Юдкина (188). Флуориметрический метод определения общего тиамина в крови и печени (по Г. Д. Елисеевой) (190).Определение общего рибофлавина в крови (193). Определение токоферолов в плазме крови с α, α'-дипиридилом (2, 2'-дипиридил) (195). Определение токоферолов в тканях и сыворотке крови методом колоночной хроматографии (196). Определение витамина С в плазме крови (199). Определение витамина B_{12} в биологических жидкостях и тканях (200).
3.3.10. Методы определения микроэлементов. *И. П. Кондрахин* 204
Определение кобальта в крови по методу С. И. Гусева в модификации А. А. Титовой (204). Определение йода, связанного с белком (СБЙ) в сыворотке крови по Акланду в модификации С. В. Силаевой (207). Определение марганца в крови перйодатным методом (209). Определение цинка в крови с дитизоном по Н. А. Чебатаревой (211). Флуориметрический метод определения селена с 2,3-диаминонафталином (213). Определение железа в сыворотке крови по цветной реакции с сульфонированным β-фенантролином (216). Определение меди и железа в крови по Сенделу в модификации С. Г. Кузнецова (218).

3.3.11. Методы определения активности ферментов.
И. П. Кондрахин 221
Определение активности АсАТ и АлАТ в сыворотке крови динитрофенилгидрозоновым методом (Рейтмана—Френкеля) (221). Определение активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови по реакции с 2,4-динитрофенилгидрозином (метод Севела—Товарека) (223). Определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови по гидролизу β-глицерофосфата (метод Бодански) (226). Определение активности α-амилазы в сыворотке крови, моче, дуоденальном содержимом амилоклассическим методом со стойким крахмальным субстратом (метод Каравея) (228). Определение активности сорбитолдегидрогеназы (СДГ) в сыворотке крови по реакции с резорцином (метод Севела—Товарека) (230). Определение активности креатинкиназы (КК) в сыворотке (плазме) крови с использованием креатинфосфата в качестве субстрата (232). Определение активности холинэстеразы в сыворотке крови по гидролизу ацетилхолинхлорида (234). Определение активности уреазы в сое (236). Определение активности γ-глутамилтранспептидазы (γ-глутамилтрансферазы) в сыворотке крови с помощью набора реактивов (237).
3.3.12. Определение нитратов и нитритов в кормах, крови и других биологических субстратах. *И. П. Кондрахин*. 240
Определение нитратов в кормах, крови, молоке и патологическом материале с использованием реактива Грисса (240). Определение нитритов в кормах, крови и патологическом материале с использованием реактива Грисса (243). Ионометрический метод определения нитратного азота (246).

ГЛАВА 4. **МЕТОДЫ КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**. *И. П. Кондрахин* 253

4.1. Исследование молока (молозива). 253
Определение титруемой кислотности молока (молозива) по Тернеру (253). Определение иммунных глобулинов (I_g) в молозиве (молоке) с натрия сульфитом (254). Методы определения соматических клеток в молоке (256).
Определение в молоке (молозиве) кетоновых тел, общего кальция, неорганического фосфора, магния, мочевины, витамина А (259).

4.2. Клинический анализ мочи. 260
Определение физических свойств мочи (261). Химическое исследование мочи (262). Определение pH (262). Обнаружение белка и количественное определение его (263). Обнаружение билирубина (266). Обнаружение и определение уробилиноидов (уробилина, уробилиногена) (267). Обнаружение крови и кровяных пигментов (269). Проба на миоглобин (270). Обнаружение индикана (270). Обнаружение и определение глюкозы (271). Обнаружение кетоновых тел (272). Исследование мочевого осадка (274).

4.3. Исследование кала. 278
Определение pH (278). Обнаружение крови (279). Обнаружение стеркобелина (проба Шлезингера) (280).

4.4. Исследования мокроты 280
Физические свойства (281). Микроскопия (281). Бактериоскопия окрашенных препаратов (283).

4.5. Исследование ликвора 283
Физические свойства (284). Биохимические и морфологические исследования (285). Микроскопия (286).

ГЛАВА 5. **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ И КЛИНИЧЕСКИХ ТЕСТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ВНУТРЕННИХ БОЛЕЗНЕЙ**. *И. П. Кондрахин* 288

5.1. Болезни обмена веществ 288
5.2. Болезни эндокринных органов. 296

5.3. Болезни системы крови . . . 299
5.4. Болезни сердечно-сосудистой системы . . . 302
5.5. Болезни органов дыхания . . . 302
5.6. Болезни органов пищеварения . . . 303
5.7. Болезни печени и желчных путей . . . 305
5.8. Болезни почек . . . 306
5.9. Аллергические болезни . . . 307
5.10. Аутоиммунные болезни . . . 308

ГЛАВА 6. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СОДЕРЖИМОГО РУБЦА. *В. И. Левченко* . . . 309

6.1. Органолептическое исследование . . . 310
6.2. Определение pH . . . 311
6.3. Определение общего количества летучих жирных кислот (ЛЖК) . . . 313
6.4. Хроматографический анализ летучих жирных кислот . . . 314
6.5. Экспресс-методы определения функциональной активности микрофлоры рубца . . . 317
Проба с метиленовым синим (по G. Dirksen) (317). Проба со сбраживанием глюкозы (317). Проба с восстановлением нитратов (318). Определение целлюлолитической активности микрофлоры (318). Определение амилолитической активности содержимого рубца (319). Определение активности α-амилазы (320). Определение протеиназной активности содержимого рубца (321). Определение липолитической активности содержимого рубца (322).
6.6. Определение общей кислотности содержимого рубца . . . 323
6.7. Определение азотистых веществ в содержимом рубца . . . 324
Определение общего азота в жидкости рубца (324). Определение белкового и небелкового (остаточного) азота в жидкости рубца (325). Определение аммиака (аммонийного азота) с реактивом Несслера (326). Определение аммиака микродиффузионным методом (326).
6.8. Определение нитритов в жидкости рубца . . . 329
6.9. Методы подсчета микроорганизмов в содержимом рубца . . . 330
Определение количества инфузорий (330). Подсчет бактерий (332).
6.10. Некоторые особенности исследования содержимого рубца . . . 333

ГЛАВА 7. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА КОРМОВ. *А. В. Архипов* . . . 335

7.1. Органолептическая оценка кормов . . . 336
7.1.1. Оценка качества зеленых кормов . . . 336
7.1.2. Оценка качества сена . . . 338
7.1.3. Оценка качества силоса . . . 339
7.1.4. Оценка качества сенажа . . . 341
7.1.5. Оценка качества искусственно высушенных кормов . . . 342
7.1.6. Оценка качества зерновых кормов . . . 344
7.1.7. Оценка качества мучнистых кормов . . . 346
7.1.8. Оценка качества жмыхов и шротов . . . 348
7.1.9. Оценка качества кормовой муки животного происхождения . . . 349
7.1.10. Оценка качества кормовых жиров . . . 351
7.1.11. Оценка качества комбикормов . . . 353
7.1.12. Оценка качества белково-витаминно-минеральных и амидо-витаминно-минеральных добавок . . . 354
7.1.13. Оценка качества премиксов . . . 356
7.2. Химические методы оценки качества кормов . . . 358
7.2.1. Определение первоначальной воды (ГОСТ 13496.3—92) . . . 359

7.2.2. Определение гигроскопической воды 360
7.2.3. Определение содержания азота и сырого протеина по Кьельдалю (ГОСТ Р 51417—99 (ИСО 5983—97)) 362
7.2.4. Определение содержания сырой клетчатки (ГОСТ 13496.2—91) . 366
7.2.5. Определение сырой золы (ГОСТ 13979.6—69) 368
7.2.6. Определение содержания кальция (ГОСТ 17258—71) 370
7.2.7. Определение содержания фосфора (ГОСТ 26657—97) 373
7.2.8. Определение сырого жира (ГОСТ 13496.15—97) 377
7.2.9. Определение содержания каротина (ГОСТ 13496.17—95) 378
7.2.10. Определение общей кислотности (ГОСТ 13496.12—98) 382
7.2.11. Определение кислотного числа жира (ГОСТ 13496.18—85) 383
7.2.12. Определение активности уреазы в жмыхах и шротах (ГОСТ 13979.9—69) 386

ГЛАВА 8. МЕТОДЫ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.
Г. А. Таланов 388
8.1. Объекты токсикологического исследования 388
8.2. Методы определения фосфорорганических пестицидов 390
8.3. Методы определения синтетических пиретроидов 396
8.4. Методы определения гербицидов группы 2,4-Д 398
8.5. Методы определения родентицидов (зоокумарина, бромадиолона, бродифакума, цинка фосфида) 401
8.6. Методы определения микотоксинов 408
Определение Т-2-токсина в кормах с применением иммуноферментного анализа (408). Определение дезоксиниваленола в зерне с применением обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (412). Количественное определение афлатоксинов B_1 и S_1 в кормах (414).
8.7. Метод определения натрия хлорида в патологическом материале (по А. Ф. Башмурину, 1968) 417
8.8. Колориметрический метод определения нитратов и нитритов (по Е. С. Ковалевой, 1985) 419
8.9. Методы определения алкалоидов 422
Определение алкалоидов методом ТСХ (по В. М. Серову, В. А. Волковой, 1979) (424).
8.10. Методы определения цианидов 427
8.11. Методы определения тяжелых металлов: ртути, кадмия, свинца, меди 429
Атомно-абсорбционный метод определения ртути в тканях животных, мясе и других продуктах животного происхождения (по В. В. Ермакову, 1987) (429). Определение свинца в органах и тканях животных посредством ААС (по В.В. Устенко, 1980) (431).
Источник литературы 434

ГЛАВА 9. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГОРМОНОВ. *В. И. Левченко* 435
9.1 Определение трийодтиронина (T_3) в сыворотке или плазме крови (Diagnostic System Laboratory, США) 435
9.2. Определение тироксина (T_4) в сыворотке крови (Diagnostic System Laboratory, США) 437
9.3. Определение тиреотропина (ТТГ) в сыворотке крови (Diagnostic System Laboratory, США) 440
9.4. Определение кортизола в сыворотке (плазме) крови (Diagnostic System Laboratory, США) 443
9.5. Определение инсулина в сыворотке (плазме) крови (Diagnostic System Laboratory, США) 446

9.6. Определение паратиреоидного гормона (ПТГ) в сыворотке (плазме) крови (Diagnostic System Laboratory, США) 449
9.7. Определение кальцитонина в сыворотке крови (Diagnostic System Laboratory, США). 452
9.8. Определение тестостерона в сыворотке крови (Diagnostic Automation Inc., США) 455
9.9. Определение прогестерона в сыворотке или плазме крови (Diagnostic Automation Inc., США). 457
9.10. Определение эстрадиола в сыворотке или плазме крови (Diagnostic Automation Inc., США). 460
ГЛАВА 10. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОМЕОСТАЗА МОЛОДНЯКА. *В. И. Левченко.* 463
10.1. Морфологический состав периферической крови и уровень гемоглобина. 463
10.2. Белковый состав сыворотки крови 470
10.3. Особенности естественной резистентности и иммунной реактивности молодняка 474
10.4. Динамика возрастных иммунных дефицитов 481
10.5. Кислотно-щелочной баланс у новорожденных телят 483
10.6. Функциональное состояние печени у молодняка 484
10.7. Некоторые показатели витаминного обмена у молодняка. 489
10.8. Гомеостаз минеральных элементов. 493
10.9. Гормональный статус молодняка 495
Источник литературы 497
Приложения. *И. П. Кондрахин* 499
Указатель литературы (источники). *И. П. Кондрахин*. 511

Справочное издание

Иван Петрович Кондрахин, Алексей Васильевич Архипов, Владимир Иванович Левченко, Герман Александрович Таланов, Людмила Александровна Фролова, Виктор Эммануилович Новиков

МЕТОДЫ ВЕТЕРИНАРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Справочник

Художественный редактор *В. А. Чуракова*
Технический редактор Н. Н. Зиновьева, Корректор *Н. П. Мурзаева*

Сдано в набор 06.02.04. Подписано в печать 21.07.04. Формат 60×88 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Ньютон. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 31,85 + 0,49 вкл. Уч.-изд. л. 36,32. Изд. № 072. Тираж 2000 экз.

Заказ № 4196.

ООО «Издательство «КолосС», 101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 17.
Почтовый адрес: 129090, Москва, Астраханский пер., д. 8.
Тел. (095) 280-99-86, тел./факс (095) 280-14-63, e-mail: koloss@koloss.ru,
наш сайт: www.koloss.ru

Отпечатано с готовых диапозитивов
на ФГУП ордена «Знак Почета» Смоленская областная
типография им. В. И. Смирнова
214000, г. Смоленск, проспект им. Ю. Гагарина, 2

ISBN 5-9532-0165-6

9 785953 201650